Die OXI3-Region der mtDNS der Hefe : Genetische Kartierung und Nachweis Sequenz-spezifischer Deletionen

HELMUT PETER BRUCKNER

Diss.
München
1984

Die OXI3-Region der mtDNS der Hefe : Genetische Kartierung und Nachweis Sequenz-spezifischer Deletionen

Dissertation der Fakultät für Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

HELMUT PETER BRUCKNER

1. Berichterstatter: Prof.Dr.R.J.Schweyen
2. Berichterstatter: Prof.Dr.K.Wolf

Tag der mündlichen Prüfung: 16.Januar 1984

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

A) EINLEITUNG 1 - 9

B) MATERIAL und METHODEN 10 - 23

1.) Stämme; Tab. 1 10 - 11
2.) Medien 12
3.) Chemikalien und Bezugsquellen 13
4.) Methoden 13 - 23
4.1. Mutagenese und Isolierung von mit⁻ Mutanten der OXI3-Region 13 - 14
4.2. Bestimmung der Rate spontaner Reversion der mit^-_{oxi3} Mutanten 14 - 15
4.3. rho⁻ Retentionskartierung 16 - 17
4.4. "Cytoduction" - Umkreuzung mit Hilfe der kar1-Mutation 17 - 19
4.5. Qualitative Rekombinationsanalyse 19
4.6. Quantitative Rekombinationsanalyse 20
4.7. Komplementationstest 20 - 21
4.8. Atmungsmessung an ganzen Zellen 21
4.9. Test auf Temperatursensitivität 21
4.10. Tieftemperatur-Cytochromspektren 22
4.11. Isolierung mitochondrialer DNS 22 - 23
4.12. Restriktionsverdauung und elektrophoretische Auftrennung von mtDNS-Fragmenten 23

C) ERGEBNISSE 24 - 69

1.) Genetische Feinstrukturanalyse der OXI3-Region 24 - 48
1.1.) Induktion und Isolierung von mit⁻ Mutanten der OXI3-Region 24 - 26
1.2.) Erste Retentionskartierung 26 - 28
1.3.) Qualitative Rekombinationsanalyse 29 - 33
1.4.) Isolierung und Subklonierung von rho⁻ Mutanten der OXI3-Region 34 - 36
1.5.) Retentionskartierung 36 - 42
1.6.) Quantitative Rekombinationsanalyse 43 - 46
1.7.) Komplementation 47 - 48

2.) Untersuchungen des Phänotyps 49 - 62
2.1.) Temperatursensitivität und "leakiness" 49 - 51
2.2.) Tieftemperatur-Cytochromspektren 51 - 52
2.3.) Atmungsmessung an ganzen Zellen 52 - 53
Tab. 2: Phänotypen der mit^-_{oxi3} Mutanten 54 - 58
Tab. 3: Liste der rho⁻ Mutanten 59 - 62

3.) Restriktionsanalyse der mit⁻ Deletionsmutanten 63 - 69
Tab. 4: Gruppierung der mit⁻ Deletionsmutanten nach physischen Kriterien 69

D) DISKUSSION 70 - 86

1.) Genetik 71 - 74
2.) Phänotypen 74 - 77
3.) Restriktionsanalyse 78 - 79
4.) Präferentielle Deletionsendpunkte 80 - 86

Zusammenfassung 87

E) LITERATUR 88 - 106

Abkürzungsverzeichnis

bp	Basenpaare
DNS	Desoxyribonukleinsäure
kb(p)	Kilobasen(paare)
min	Minuten
mit$^-$	atmungsdefekte Punktmutanten (Definition, s.S.5)
mit$^-\Delta$	atmungsdefekte Deletionsmutanten (s.S.73)
mM	millimolar
mRNS	messenger-Ribonukleinsäure
mtDNS	mitochondriale DNS
OXI3	Genregion auf der mitochondrialen DNS, welche die Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase codiert
rho$^-$	atmungsdefekte, mitochondriale petite-Mutanten (s.S.5)
rho^0	Mutante, die das gesamte mitochondriale Genom verloren hat
tRNS	transfer-Ribonukleinsäure

A) EINLEITUNG

Mitochondrien verfügen über ein autonomes genetisches System. Diese Tatsache und insbesondere die relative Kleinheit des mitochondrialen Genoms, sowie der Umstand, daß es mit dem Kerngenom kooperiert, haben es zu einem bevorzugten Objekt molekularbiologischer Forschung werden lassen.

Die mitochondriale DNS (mtDNS) der Bäckerhefe Saccharomyces cerevisiae ist ein zirkuläres, 73,5 - 82,3 kb langes Molekül (1,2) und hat somit theoretisch eine für etwa 100 Gene ausreichende Codierungskapazität (3). Der Teil der Mitochondrienproteine, die mitochondrial transkribiert und translatiert werden, konnte als 5% - 10% bestimmt werden (4), während der Rest im Kern codiert und an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert wird. In zahlreichen genetischen und biochemischen Untersuchungen an diesem Organismus wurde eine Vielzahl von Daten über Lage und Funktion einer Reihe mitochondrialer Gene zusammengetragen (vgl. Abb.1):

Mitochondrial codiert sind danach 25 verschiedene tRNS-Spezies (5-21), die beiden ribosomalen RNS-Typen, die 21S- und 15S-Spezies (22-30), sowie wenigstens neun Polypeptide:

- Die Untereinheiten 6 und 9 der Oligomycin-sensitiven ATPase (31-33).
- Ein als VAR1 bezeichnetes Protein unbekannter Funktion, das vermutlich mit der kleinen Untereinheit der mitochondrialen Ribosomen assoziiert ist (33-36).
- Die Untereinheiten I, II und III der Cytochrom c Oxidase (37-44; 10,43,45-49; 43-50).
- Das Apoprotein des Cytochrom b (43,44,51-59).
- Mehrere, den inner- und außerhalb (URF1 und URF2) bekannter Gene gefundenen offenen Leserahmen zugeordnete, mutmaßlich an der Transkriptreifung beteiligte Proteine (60-62).

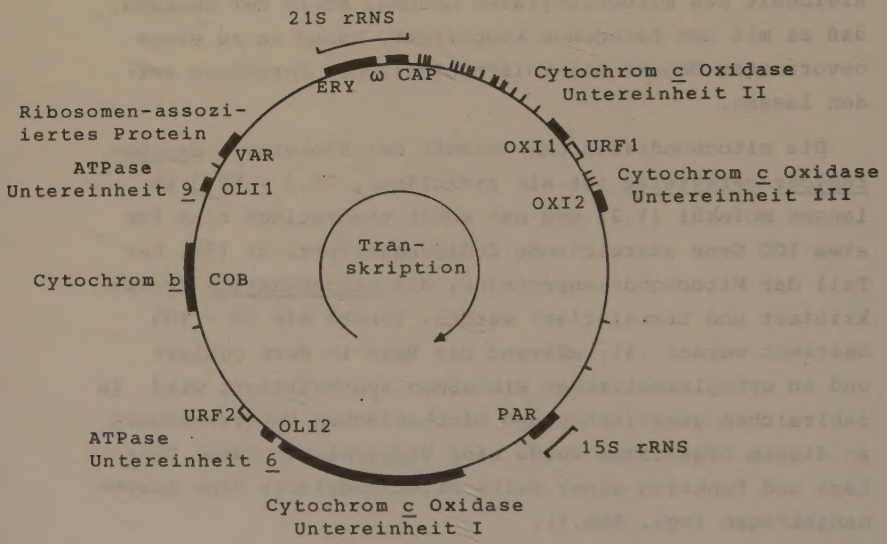


Abbildung 1 : Genetische Karte der mtDNS von Saccharomyces cerevisiae (Größenverhältnisse entsprechen dem Stamm D 273-10B; nach GRIVELL, 1982 (2)).

Der durchgezogene Kreis stellt das mtDNS-Molekül dar. Auf ihm sind die Genregionen hervorgehoben (dunkel-verstärkte Linie) und auf der Innenseite des Kreises mit der Bezeichnung des Genlocus versehen. Außerhalb des Kreises sind die diesen Genorten zugeordneten Genprodukte bezeichnet. Als URF (unassigned reading frame) werden Leserahmen bezeichnet, deren Sequenz potentiell codierend ist, denen aber noch kein bestimmtes Polypeptid zugeordnet werden konnte (hell-verstärkte Linie). Die tRNS-Gene sind durch ⊥ symbolisiert. Die generelle Transkriptionsrichtung verläuft im Uhrzeigersinn. Die Transkripte der rRNA: 21S liegt im ERY/CAP-, 15S im PAR-Bereich.

Am Besten untersucht unter den Protein-codierenden mitochondrialen Genen ist bislang das als COB-Region bezeichnete, welches die Synthese der Atmungskettenkomponente Cytochrom b steuert. Von dieser Genregion wurden genetische und physische Feinkarten erstellt (43,55,63-66), auf deren Grundlage weitergehende Studien, die Organisationsstruktur dieses Gens betreffend, möglich waren.

Verschiedenen Autoren gelang es durch an cob$^-$ Mutanten (das sind Stämme mit Atmungsdefekt aufgrund einer Störung des Cytochrom b-Gens) durchgeführten Untersuchungen der mitochondrialen Translationsprodukte (54,56,59, 65-69) und Transkriptmuster (44,52,57,70) zwei in alternierenden Clustern auftretende Typen von Mutationen nachzuweisen, die Sequenzen unterschiedlicher Funktionen zu besetzen scheinen: Apocytochrom b-codierende, als Exons bezeichnete Bereiche werden getrennt durch sogenannte Intron-Sequenzen unbekannter Funktion. Letztere werden in einem post-transkriptionalen Prozeß eliminiert, so daß nach geregeltem Verlauf dieses "processing" die reife, eigentliche Boten-RNS für das Cytochrom b vorliegt. Wegen dieser Besonderheit der Organisation wird das COB-Gen als "split-gene" oder auch als Mosaik-Gen bezeichnet, in begrifflicher Anlehnung an ähnliche, bereits an Kerngenen anderer eukaryotischer Organismen gemachte Befunde(71-74).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit gab es eine Reihe von Hinweisen, die vermuten ließ , daß auch die OXI3-Region, der die Codierung der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase zugeschrieben wird (75,76), ein solches "split-gene" sein könnte. Erste Kartierungsversuche (43,63) hatten bereits gezeigt, daß diese Region, die zwischen den Genorten PAR und OLI2 lokalisiert wurde (vgl. Abb.1), in ihrer Codierungskapazität wahrscheinlich um ein Vielfaches größer ist, als für das ihr zugeordnete Genprodukt nötig.

Dieser Befund legte es nahe, auch für die OXI3-Region zunächst eine ausgedehnte genetische Feinstrukturanalyse in Angriff zu nehmen, um damit eine Ausgangsbasis zur Klärung ihrer Organisationsstruktur in die Hand zu bekommen.

Durch den Umstand, daß der Bäckerhefe neben der Atmung ein alternativer Weg zur Energiegewinnung, - die Gärung zur Verfügung steht, ist es möglich atmungsdefekte Mutanten weiterzuvermehren und für Kreuzungsexperimente heranzuziehen. In der Nachkommenschaft aus Kreuzungen solcher zur Atmung inkompetenter Zellen können neben den Parentaltypen auch Rekombinanten auftreten, welche die Fähigkeit zu atmen zurückgewonnen haben. Dies läßt sich mit einem einfachen Selektionssystem leicht nachweisen:

Atmungsdefiziente Zellen wachsen nur auf vergärbaren Substraten, wie z.B. Glukose; auf nicht-vergärbaren Substraten , wie Glycerin, ist dagegen kein Wachstum möglich. Im Unterschied dazu zeigen atmungskompetente Zellen (wie Wildtyp-Rekombinanten) Wachstum auf beiden Arten von Nährmedien:

	vergärbares Substrat	nicht-vergärbares Substrat
atmungsfähige Zellen	+	+
atmungsdefekte Zellen	+	-

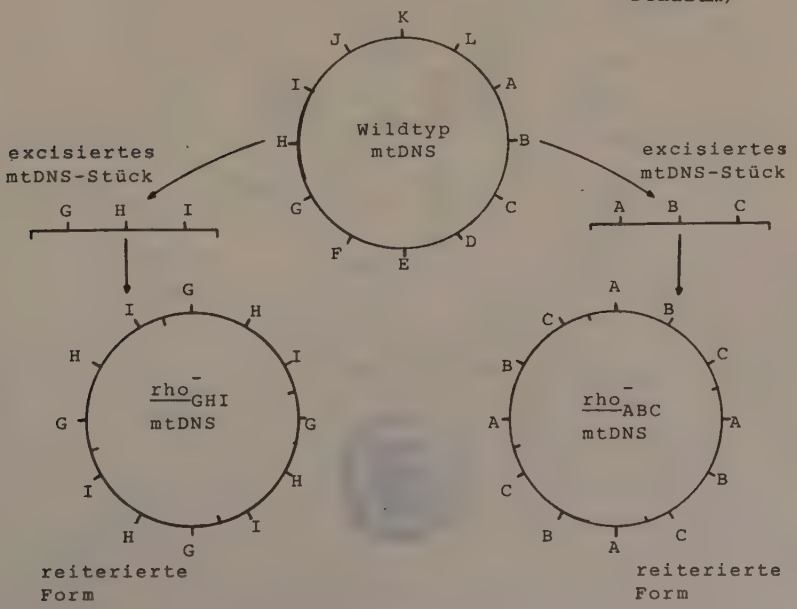
Wachstum

Ein relativ schneller Weg, eine große Zahl atmungsdefekter mitochondrialer Mutanten in die lineare Ordnung einer genetischen Karte zu bringen, bietet sich durch die Existenz zweier unterschiedlicher Mutantentypen:

mit⁻ Mutanten tragen Punktmutationen (Substitution eines Basenpaares) oder Deletionen (Verlust mehrerer Basenpaare) in einzelnen Protein-codierenden Genen der mtDNS; das mitochondriale Proteinsynthese-System bleibt dabei funktionsfähig. Eine Folge des genetischen Defekts ist die Unfähigkeit solcher Zellen, auf nicht-vergärbaren Substraten zu wachsen.

rho⁻ Mutanten sind charakterisiert durch den Verlust von gewöhnlich mehr als 50% ihrer mtDNS (77,78), wobei das zurückbehaltene Restgenom - als reiterierte Sequenz - zur Gesamtlänge der Wildtyp-mtDNS amplifiziert vorliegt (79-82) (Abb.2-1). Wegen des großen Umfangs der Deletionen fehlen den rho⁻ Zellen tRNS-Spezies und intakte Ribosomen, die für ein funktionstüchtiges mitochondriales Translationssystem nötig wären.

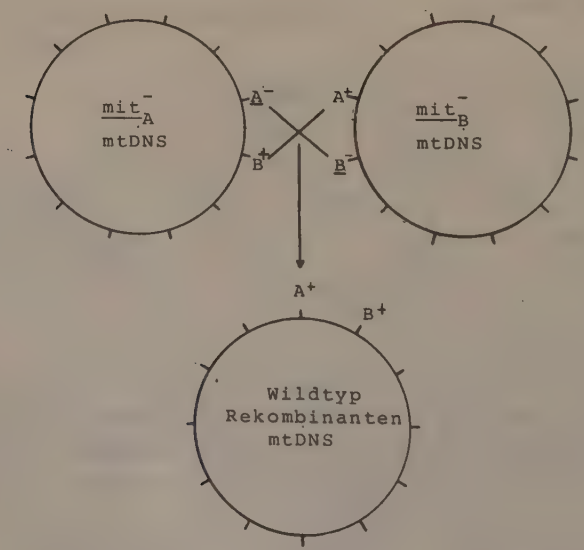
Abb.2-1: rho⁻ Bildung (mit hypothetischem Zwischenstadium)



Zum besseren Verständnis der im weiteren ausgeführten Kreuzungsexperimente sollen hier die sich aus den Kombinationen dieser Mutantentypen prinzipiell ergebenden Möglichkeiten einer Rekonstitution der Atmungsfähigkeit durch Rekombination skizziert werden.

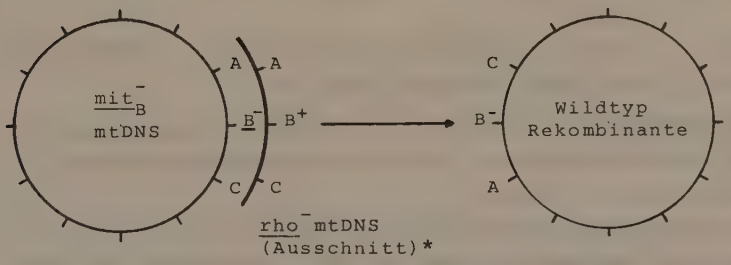
$\underline{mit}^-$ x $\underline{mit}^-$: Bei Kreuzung zweier nicht-identischer Punktmutanten $\underline{mit}^-_A$ und $\underline{mit}^-_B$ miteinander wird - in der Form von Wachstum auf nicht-vergärbarem Substrat nachweisbare - Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit in der Nachkommenschaft zu beobachten sein: Durch ein Rekombinationsereignis kann ein mtDNS-Molekül entstehen, das die in den Kreuzungspartnern mutierten Marker $\underline{A}^-$ und $\underline{B}^-$ im Wildtypzustand enthält (Abb.2-2).

Abb.2-2: Kreuzung $\underline{mit}^-$ x $\underline{mit}^-$



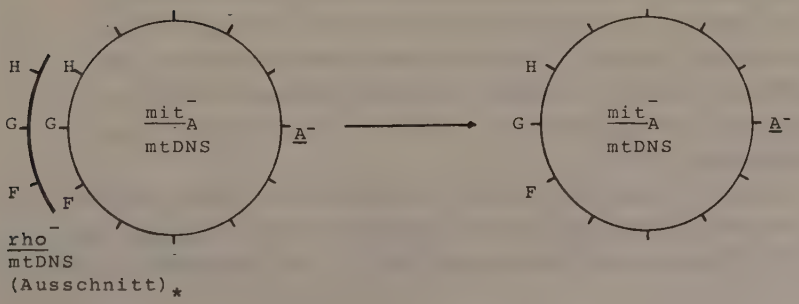
$\underline{mit}^-$ x $\underline{rho}^-$: Hier findet eine Rekonstitution nur dann statt, wenn die in der jeweiligen $\underline{mit}^-$ Mutante von der Mutation betroffene(n) Base(n) im Bereich des von der $\underline{rho}^-$ Mutante zurückbehaltenen mtDNS-Stücks liegt, wie es in dem unter Abb.2-3 dargestellten Schema der Fall ist: Der Marker $\underline{B}^-$ der $\underline{mit}^-$ Mutante ist im Restgenom der $\underline{rho}^-_{ABC}$ enthalten. Dagegen fällt in dem unter Abb.2-4 gezeigten Beispiel der mutierte Marker $\underline{A}^-$ der Punktmutante nicht in den Bereich der mtDNS-Sequenz der $\underline{rho}^-_{FGH}$.

Abb.2-3: Kreuzung $\underline{mit}^-$ x $\underline{rho}^-$



*) Monomer des $\underline{rho}^-$ Gesamtgenoms

Abb.2-4:



rho⁻ x rho⁻ : Die Ergänzung zweier rho⁻Genome zu einem kompletten Wildtyp-mtDNS-Molekül, welches die betreffende Zelle zur Energiegewinnung durch Atmung befähigen würde, konnte experimentell nicht realisiert werden. Dies ist nicht allein mit dem äußerst seltenen Auftreten von rho⁻Genomen, die weniger als 50% des Gesamtgenoms deletiert haben, erklärbar. Vielmehr schließt vermutlich der Mangel eines Proteinsyntheseapparates bei beiden Kreuzungspartnern dessen de novo-Rekonstitution prinzipiell aus.

Einen Sonderfall, auf den an späterer Stelle ausführlich eingegangen werden soll, stellen die Kreuzungen derjenigen Mutanten vom mit⁻Typ dar, die Deletionen von bis zu 15% des mitochondrialen Genoms tragen.(s.S.30f).

Durch geeignete Kreuzungen solcher Mutanten lassen sich aus deren Ergebnissen Schlüsse ziehen auf

- die Ausdehnung von Deletionen innerhalb eines Genlocus, mit⁻Deletionsmutation (Qualitative Rekombinationsanalyse, S.30, C.1.3.)
- die Größe eines Restgenoms, rho⁻Retention (S.35, C.1.5.)
- Lage und relative Abstände der mutierten Marker auf der mtDNS zueinander, mit⁻Punktmutationen (S.35, C.1.5. und S.43, C.1.6.).

Der Mangel der genetischen Kartierungsmethoden liegt darin, daß mit ihnen Lage oder Ausdehnung von Mutationen jeweils nur relativ zu anderen Mutationen definiert werden können, z.B. der Umfang einer rho⁻Retention nur in der Anzahl der mit⁻Marker, die sie rekonstituieren kann, ausgedrückt ist.

So lag es nahe, durch eine Restriktionsanalyse geeigneter Mutanten die Dimensionen (ausgedrückt in Basenpaaren) der OXI3-Region oder von Teilen von ihr zu bestimmen. Eine

Korrelation physischer und genetischer Daten ermöglicht erst, ein Bild des Genorts zu entwerfen, das den tatsächlichen molekularen Verhältnissen entspricht.

B) MATERIAL UND METHODEN

1.) Stämme

Die in der Arbeit verwendeten Stämme sind in der Tab.1 aufgeführt. Diejenigen Mutantenstämme mit Defekt in der OXI3-Region, die als mit$^-$ Punktmutanten oder als mit$^-$ Deletionsmutanten ausgewiesen sind, wurden aus dem Wildtypstamm 777-3A , nach Manganchlorid ($MnCl_2$)-Behandlung (83,84) isoliert ; sie sind durch den die Stammbezeichnung anführenden Buchstaben 'M' bzw. 'MA...MH' gekennzeichnet. Einige der Mutantenstämme, entsprechend als 'U'-Serie gekennzeichnet, wurden durch UV-Licht-Bestrahlung - vgl.(85) - gewonnen.

Die als rho$^-$ charakterisierten Stämme der OXI3-Region wurden teilweise im Wildtypstamm RM 511-4A unter Verwendung der Kernmutation tsp (86) induziert: 'HA...HF'-Serie.
Die mit 'HK' bezeichnete rho$^-$ Serie wurde nach $MnCl_2$-Behandlung vom Wildtypstamm KL 14-4A abgeleitet (85).

Tabelle 1 : Verzeichnis der verwendeten Stämme

Stamm	Genotyp		Bemerkung	Referenz
	Kern	Mitochondrien		
777-3A	α, ade1,op1	ρ^+, mit^-	Für das mitochondriale Genom Wildtyp; alle $\underline{mit}^-_{oxi3}$ Mutanten sind von diesem Stamm abgeleitet.	(87)
RM 511-4A	a, ura1, trp1	ρ^+, ery^r, oli^r2, par^r	Zur $\underline{rho}^-$Bildung verwendet: Serie 'HA...HF'.	(84)
KL 14-4A	a, his1, trp2	ρ^+, cap^r, oli^r1, par^r	Zur $\underline{rho}^-$Bildung verwendet: Serie 'HK'.	(88)
RM 590-9D	a, trp1	ρ^0	Zum Einkreuzen des OP1-Markers in op1-Mutanten.	(84)
IC8/AA1	a, leu1, kar1	ρ^0	Zur Überführung von α $\underline{mit}^-$Stämmen in den anderen Paarungstyp verwendet.	(89)
SM11-6A	a, ura1	ρ^0	Zur Herstellung Diploider für die Spektralanalyse verwendet.	(90)

2.) Medien

YNB-Medium: 0,7% Difco Yeast Nitrogen Base 3%Glukose
1,5% Agar (Difco)

YNB-Leu-Medium: wie YNB, + 0,03% Leucin

Alle folgenden Medien enthalten 1% Yeastextrakt, im Falle von Festmedien zusätzlich 1% Agar (Difco) und unterscheiden sich untereinander nur in der Kohlenstoffquelle:

YD-Medium: 3% Glukose

YG-Medium: 3% Glycerin

YGD-Medium: 3% Glycerin + 1% Glukose

YGal-Medium: 3% Galaktose

YÄG-Medium: 3% Glycerin + 1% Äthanol

Die Medien werden zum Schutz vor bakterieller Kontamination mit dem Antibiotikum Penicillin oder Streptomycin versetzt.

Phosphatpuffer: 1M , pH 6,2

KH_2PO_4 408.27g ad 3 Ltr. H_2O

Na_2HPO_4 283.92g ad 2 Ltr. H_2O

Lösungen mischen und pH einstellen.

Elektrophoresepuffer TEB pH 8,3

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA,

vgl. (91).

3.) Chemikalien und Bezugsquellen

Agar	Difco, Detroit, USA
Agarose	Seakam, Marine Colloids, USA
Bisbenzimid	Riedel de Haen, Seelze
Bromphenolblau	Merck,Darmstadt
Caesiumchlorid	Baker, Devernter, Niederlande
Dithionit	Merck, Darmstadt
EDTA	Sigma, St.Louis, USA
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg
Mercaptoäthanol	Merck, Darmstadt
Penicillin	Serva, Heidelberg
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
Restriktionsenzyme	Bethesda, Rockville/Maryland, USA
Streptomycin	Serva, Heidelberg
SDS	BHD Ltd., Poole, Großbritannien
TRIS (Trizma Base)	Sigma, St. Louis , USA
Yeastextrakt	Difco, Detroit, USA
Yeast Nitrogen Base	Difco, Detroit, USA
Zymolyase	Kirin, Brewery Co.Ltd., Takasaki, Japan.

4.) Methoden

4.1.) Mutagenese und Isolierung von mit⁻Mutanten der OXI3-Region

Zur Induktion von mit⁻Mutanten wurde der bezüglich des mitochondrialen Genoms im Wildtypzustand befindliche Stamm 777-3A verwendet, der die Kernmutation op1 trägt, welche Letalität von rho⁻Mutanten bewirkt (87), so daß unter der von diesem Stamm abgeleiteten Nachkommenschaft nur Mutanten vom mit⁻Typ zu erwarten sind (64).

Zu Zellen dieses Stammes, die in flüssigem YD-Medium hochgezüchtet werden, wird bei einem Titer von 10^4 Zellen/ml $MnCl_2$ in einer Endkonzentration von 5mM bzw. 10mM zugegeben (Abb.3-a) und anschließend das Induktionsgemisch ca.drei Tage auf einem Schüttler bei 30°C bebrütet (Endkonz. 10^7). Zur

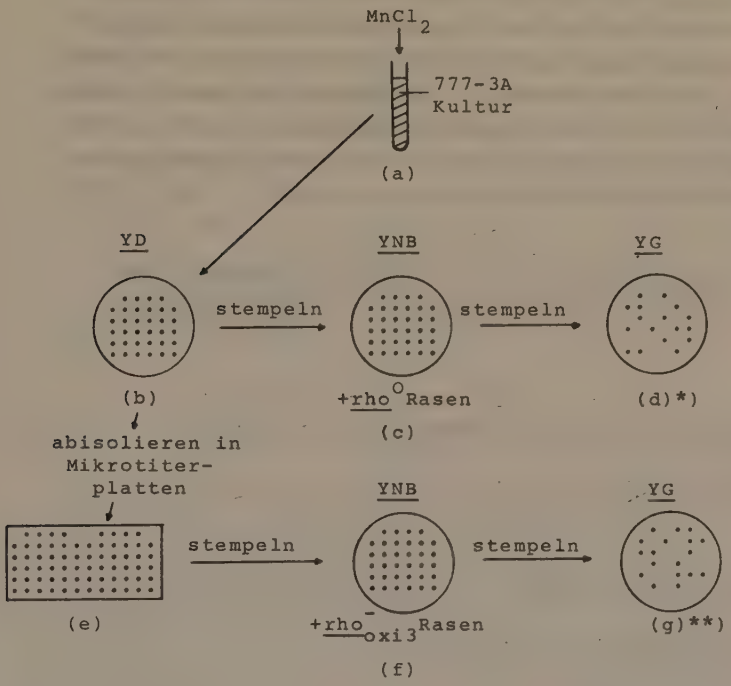
Isolierung atmungsdefekter Mutanten wurden zunächst je etwa 200 Zellen auf YD-Medium aufgetragen und nach Zwischenbebrütung das sichtbare Koloniemuster (Abb.3-b) mit Hilfe der Samt-Replika-Methode (92) auf YNB-Platten übertragen (Abb.3-c). Diese Platten trugen einen Rasen mit Zellen des rho^0Stammes RM 590-9D (mit dem OP1-Marker im Kerngenom); das Einkreuzen dieses nuclearen Markers ist notwendig, um die rezessive op1-Mutation, die im Kernhintergrund aller vom 777-3A abgeleiteten mit^-Stämme vorhanden ist, in ihrer Wirkung zu eliminieren: Diese besteht darin, daß sie auch von mit^+Zellen ein Wachstum auf YG-Platten verhindert, auf denen diese sonst wachsen könnten. Nach Ausschaltung des op1-Effekts dagegen kann mit dem Glycerin-Medium nach atmungsdefekten Mutanten gesucht werden: mit^-Zellen zeigen kein Wachstum (Abb.3-d).

Die als inkompetent zur Energiegewinnung durch Atmung identifizierten Einzelkolonien werden anschließend von der YD-Mutterplatte (3-b) in Mikrotiterplatten abisoliert (Abb.3-e). Von dort werden sie dann mit Hilfe eines Metallzackenstempels auf YNB-Platten übertragen, welche mit dem Rasen eines rho^-Testerstammes bewachsen waren, der den gesamten bekannten OXI3-Bereich der mtDNS zurückbehalten hat (Abb.3-f). Zellen derjenigen mit^-Mutanten, die nach Kreuzung mit einer rho^-_{oxi3} in der diploiden Nachkommenschaft auf YG-Medium Rekonstitution der Atmungsfähigkeit zeigten (Abb.3-g), wurden dann als mit^-_{oxi3} isoliert (Abb. 3-e bis 3-g).

4.2. Bestimmung der Rate spontaner Reversion der mit^-_{oxi3} Mutanten

Die mit^-_{oxi3}Stämme wurden mit dem rho^0Stamm RM 590-9D gekreuzt und nach Anzucht bis zu einem Titer von ca. 10^8 Zellen/ml wurden 0,1ml auf YG-Platten aufgetragen und bei 30^oC fünf Tage bebrütet; nur Revertanten können wachsen (s.S.52f, Tab.2).

Abb.3 : Schematische Darstellung der Isolierungsmethode von mit⁻ Mutanten der OXI3-Region. Erläuterungen siehe nebenstehender Text.



*) Kolonien, die hier nicht wachsen können, werden als mit⁻ in Mikrotiterplatten von der Mutterplatte isoliert.

**) Kolonien, die hier wachsen, sind mit⁻oxi3

4.3. rho⁻ Retentionskartierung

Das Prinzip der Kreuzungen vom Typ mit⁻ x rho⁻ wurde bereits an früherer Stelle ausgeführt (s.S. 7f, Abb.2-3 und 2-4). Aus dem Resultat einer Kreuzung mehrerer rho⁻ Mutanten gegen eine Serie von mit⁻Stämmen - d.h. aus dem Auftreten von Rekonstitution der Atmung oder deren Fehlen (vgl. Abb.4-a) - läßt sich auf die lineare Anordnung der mit⁻Marker und den Umfang der Retention der verschiedenen rho⁻Genome schließen (Abb.4-b); vgl.(43,84).

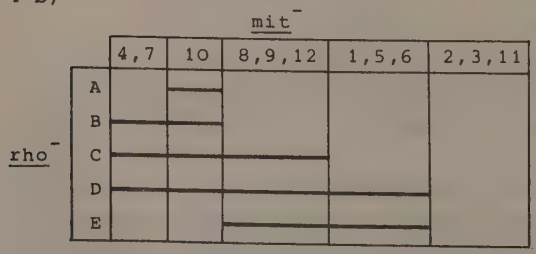
Abb.4 : Beispiel für das Prinzip der Kreuzungsanalyse bei der Retentionskartierung von mit⁻Mutanten.

4-a)

rho⁻ \ mit⁻	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
B	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
C	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+
D	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
E	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	+

Ergebnis der Kreuzungsanalyse:
Rekonstitution = +
keine Rekonst. = -

4-b)



Aus der Kreuzungsanalyse erschlossene lineare Abfolge der mit⁻Marker 1 - 12. Die durchgezogene schwarze Linie symbolisiert die zurückbehaltene mtDNS der rho⁻. Die nach rechts gelegte Markergruppe 2,3,11 kann auch links von der Gruppe 4,7 eingeordnet werden.

Wie aus dem in Abb.4 gezeigten Schema ersichtlich, lassen sich die Marker der mit⁻Mutanten nur in Abhängigkeit von der Differenziertheit der rho⁻Restgenome in verschiedene Gruppen separieren. Über die Abfolge der auf diese Weise gebildeten mit⁻Gruppen hinaus lassen sich durch die Retentionskartierung über die Lage der Marker innerhalb einer Gruppe keine Aussagen machen. Auch deren relative oder physische Abstände sind nur mit Hilfe anderer, an späterer Stelle noch zu erwähnender Methoden zu erschließen.

Lassen sich die Kreuzungsdaten, wie in dem exemplarischen Schema, widerspruchsfrei anordnen, kann man annehmen, daß die von den rho⁻Stämmen zurückbehaltene mtDNS kontinuierliche Stücke der Wildtyp-Sequenz darstellt.

4.4. "Cytoduction" - Umkreuzung mit Hilfe der kar1-Mutation

Bei der Bäckerhefe treten, - wie unter Ascomyceten, denen sie systematisch zugerechnet wird, sehr verbreitet - zwei verschiedene Paarungstypen, a und α auf. Ihre genetischen Determinanten liegen im Kerngenom und bewirken, daß zwei Zellen mit gleichem Paarungstyp inkompatibel sind, d.h. nicht miteinander gekreuzt werden können. Um nun für bestimmte Kreuzungsexperimente die mit⁻Stämme in beiden Paarungstypen zur Verfügung zu haben, kann man sich - anstelle umständlicherer, früher benutzter Methoden der Umkreuzung - folgender Entdeckung bedienen:

Die Kernmutation kar1 verzögert die Karyogamie nach der Zygotenbildung erheblich oder verhindert sie (89). Als Folge davon ist bei Knospung einer somit heterokaryotischen Zygote, nach Segregation der Kerne, die Mehrzahl der Nachkommenschaft haploid, ausgestattet mit dem Kerngenom des einen oder anderen Kreuzungspartners.

Diesen Effekt kann man nutzen, um die vom Stamm 777-3A abgeleiteten , im Paarungstyp α befindlichen mit^-_{oxi3}Stämme in den anderen Paarungstyp überzuführen; diese werden zu diesem Zweck mit dem die kar1-Mutation tragenden rho^oStamm IC8/AA1 gekreuzt:

α KAR ade ; mit^-_{oxi3} x a kar1 leu ; rho^-

Die bereits erwähnte Wirkung der kar1-Mutation auf die Kernfusion (s.S.17) ermöglichte die Entstehung haploider Nachkommen vom Typ a mit^-_{oxi3}, d.h. der gleiche mitochondriale Genotyp mit dem Paarungstyp a liegt vor.

Die technische Durchführung solcher Umkreuzungen geht so vor sich, daß zunächst jeweils 0,1 ml physiologisch aktiver Zellen des a rho^oStammes mit der selben Menge der α mit^-_{oxi3}Mutante zu einem Tropfen vereinigt und auf einer YD-Platte etwa fünf Stunden bei 30°C bebrütet werden. Innerhalb dieses Zeitraums gebildete Zygoten sind anhand ihrer charakteristischen Gestalt unter dem Mikroskop zu beobachten. Befinden sich mindestens 10% der Zellen im Zustand von Zygoten, wird das Kreuzungsgemisch in YD-Flüssigmedium über Nacht weitergezüchtet, um eine schnelle Segregation zu ermöglichen. Anschließend werden in geeigneter Verdünnung je 0,2 ml der Kultur auf YNB-Leu-Platten ausgebracht, so daß nach zwei bis fünf Tagen der Bebrütung zu Einzelkolonien hochgewachsene mit^-Klone (ca. 100 - 200 pro Platte) sichtbar werden. Auf dem mit Leucin versetzten Minimalmedium (0,03% Leucin pro Platte) können nur drei Arten von Produkten der Kreuzung α mit^-_{oxi3} x a rho^- wachsen, die aufgrund ihrer unterschiedlichen Koloniegöße leicht zu unterscheiden sind:

$\frac{a}{\alpha}$	$\frac{karl}{KAR}$	$\frac{+}{ade}$	$\frac{leu}{+}$; mit^-_{oxi3}	große Kolonien
a	karl	leu ;	rho^-	kleine Kolonien
a	karl	leu ;	mit^-_{oxi3}	mittelgroße Kolonien = umgekreuzte mit^- Mutante.

Letztere werden abisoliert und anschließend auf den Paarungstyp und das mitochondriale Genom genetisch getestet.

4.5.) Qualitative Rekombinationsanalyse

Wie bereits an früherer Stelle ausgeführt (s.S.6, Abb.2-2), können zwei atmungsdefekte Punktmutanten ihre Atmungsfähigkeit durch ein Rekombinationsereignis rekonstituieren. Um zu prüfen, ob zwei Mutanten mit^-_A und mit^-_B Rekombinanten miteinander bilden können, werden die in den beiden Paarungstypen vorhandenen Stämme über Nacht in YD-Flüssigmedium angezüchtet und dann auf YD-Platten gekreuzt, ein bis zwei Tage bebrütet (30°C) und anschließend auf YG-Platten überstempelt: Auf dem Medium mit Glycerin als Kohlenstoffquelle können nur Wildtyp-Rekombinanten (mit^+) wachsen. Paralleles Abstempeln des Koloniemusters auf YNB-Platten ist als Kontrolle des Paarungserfolges geboten; - wegen der Kern-Auxotrophie wachsen nur diploide Kolonien auf dem Minimalmedium ohne Aminosäuren (=YNB).

4.6.) Quantitative Rekombinationsanalyse

Um zu bestimmen, mit welcher Rate jeweils zwei mit^- Mutanten Wildtyp-Rekombinanten miteinander bilden, wird folgendermaßen vorgegangen:

Fünf Stunden nach Vermischung von je 0,1 ml physiologisch aktiver Zellen aus vorbereiteten Kulturen der beiden mit^-Stämme, wird die Mehrheit des Zellgemisches abgekratzt und in flüssiges Minimalmedium (15 ml YNB pro Reagenzglas)überführt. Das Kreuzungsgemisch wird zwei bis drei Tage bis zur frühen stationären Phase unter semi-aeroben Bedingungen weitergezüchtet (30^oC).
Es folgt Ausplattieren des Kreuzungsgemisches in geeigneter Verdünnung (ca. 300 Zellen pro Platte) auf YGD-Platten ; wegen der geringen Konzentration am vergärbaren Substrat Glukose können atmungsdefekte Zellen nur schwach wachsen, - sie bilden daher nur kleine Kolonieformen, während die atmungskompetenten mit^+Rekombinanten als größere Kolonien sichtbar werden.

Die Rate der Rekombinantenbildung ist definiert als Prozentanteil an der Gesamtzahl der gewachsenen Kolonien; sie ist nicht gleichzusetzen mit der Häufigkeit tatsächlich geschehener Rekombinationsereignisse, da beispielsweise zwei Rekombinationsvorgänge nebeneinander stattfinden können, die ihre Wirkung wechselseitig aufheben, d.h. keine Bildung von Rekombinanten zur Folge haben.

4.7.) Komplementationstest

Eine Serie von mit^-_{oxi3}Mutanten wurde über Nacht bei 30^oC in YD-Flüssigmedium bis zur früh-stationären Phase hochgezüchtet. Zur Zygotenbildung wurden dann jeweils zwei Stämme auf YD-Platten gekreuzt und sechs Stunden bei

30°C bebrütet. Hatten sich wenigstens 10% Zygoten gebildet, wurde das Material in ein Reagenzglas mit 5 ml 0,05 M PO_4^--Puffer suspendiert und fünf bis sechs Stunden bei 30°C geschüttelt. Dann wurde polarographisch die Sauerstoff-Aufnahme der Diploiden pro Zeiteinheit, bei 20°C, mit einer ESCHWEILER-Elektrode gemessen und der gefundene Wert gegen den photometrisch bestimmten Zelltiter korrigiert.

4.8.) Atmungsmessung an ganzen Zellen

Diploide Zellen des Genotyps $\frac{a}{\alpha}\ \frac{his}{+}\ \frac{+}{leu}\ \frac{+}{op1}$; $\underline{mit}^-_{oxi3}$ wurden ein bis zwei Tage in 5 ml YGal-Flüssigmedium angezüchtet. Nach Bestimmung des Zelltiters wurde bei 25°C und Sauerstoff-gesättigter Probe mit einer CLARK-Sauerstoffelektrode die Atmungsmessung durchgeführt. Die Dimension der Atmungsaktivität wird definiert als verbrauchte µmol O_2 / min / 10^7 Zellen.

4.9.) Test auf Temperatursensitivität

Zur Prüfung auf temperaturabhängige Atmungsdefizienz werden Diploide (vgl. 4.8.) auf YG- bzw. YÄG-Platten bei verschiedenen Temperaturen: 18°C, 30°C und 35°C bis zu zehn Tagen bebrütet. Es lassen sich drei Kategorien unterscheiden:

	Wachstumstemperatur				
	18°C	30°C	35°C		
hitze-sensibel	+	+	-	hs (ts)	
kälte-sensibel	-	+	+	cs	Symbol
hitze/kälte-sb.	-	+	-	hs/cs ("leaky")	

4.10.) Tieftemperatur-Cytochromspektren

Die $mit^-_{oxi\,3}$Mutanten werden mit einem rho^0 (SM 11-6A) auf YGal-Platten gekreuzt und als flächiger Rasen für vier Tage bei 30°C gehalten. Zellmaterial von einem solchen Rasen (auf YD-Medium übertragen, bei 4°C bis zu einer Woche konservierbar) wird dann in einem EPPENDORF-Reaktionsgefäß in 1,2 ml 75%igem Glycerin + 0,5 M NaCl möglichst dick suspendiert und mit Dithionit reduziert. Die Suspension wird mit einer Spritze in eine Aluminium-Küvette (Weglänge 2 mm) eingebracht und in flüssigem Stickstoff (77°K) tiefgefroren.

Das Spektrum im Wellenlängenbereich 620 - 500 nm wird mit einem Zweistrahl-Spektralphotometer (SHIMADZU UV 210A), das für Tieftemperatur-Spektroskopie umgebaut wurde (93), gemessen.

4.11.) Isolierung mitochondrialer DNS

Zur Präparation mitochondrialer DNS wurden Hefezellen in einem Medium aus 1% Yeastextrakt + 5% Glukose unter Schütteln (30°C) bis zur frühen stationären Phase gezüchtet. Die Isolierung von Mitochondrien erfolgte nach der Methode von LANG et al. (94):

Die Zellen wurden zuerst mit Zymolase und β-Mercaptoäthanol protoplastiert (95) und anschließend in Sorbitolpuffer (1,5 M bzw. 0,6 M Sorbitol, 2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 6,8) mit Hilfe von Glasperlen mechanisch aufgeschlossen. Die Mitochondrien wurden dann in einem fraktionellen Wasch- und Zentrifugations-Prozeß gewonnen und anschließend lysiert.

Um die Qualität des mtDNS-Materials zu erhöhen, wurde das pelletierte Gemisch aus DNS und cytoplasmatischen Bestandteilen einer Reinigung (Hydroxylapatit-Säule) und Proteinase-K-Behandlung unterzogen.

Anschließend wurde die mtDNS durch zwei-tägige Zentrifugation bei 40 000 rpm in einem Caesiumchlorid- oder Natriumjodid-Gradienten von der Kern-DNS getrennt und dann durch mehrtägige Dialyse von verunreinigenden Salzen befreit. In einem Gemisch aus Äthanol und Ammoniumacetat kann die mtDNS bei minus 20°C nahezu unbegrenzt aufbewahrt werden.

4.12.) Restriktionsverdauung und elektrophoretische Auftrennung von mtDNS-Fragmenten

Restriktionen wurden mit den Enzymen HaeIII und HpaII durchgeführt. Die Inkubation des Reaktionsgemisches erfolgte über Nacht bei 37°C, unter Verwendung von 1 - 2 units Restriktionsenzym pro µg mtDNS. Der Restriktionspuffer wurde nach Angaben des Herstellers verwendet.

Die elektrophoretische Auftrennung der Restriktionsfragmente erfolgte in horizontalen Plattengelen aus 1,5%, 1% oder 0,7% Agarose bei einer Spannung von 70 - 90 Volt. Das Agarose-Gel liegt dabei in TEB-Puffer (91). Die Probe wird vor dem Auftragen auf das Gel mit dem Farbstoff Bromphenolblau (zu 1/3 des Volumens) versetzt, welcher die Diffusion der DNS aus der Gelkammer in den Puffer verhindert und gleichzeitig die Lauffront beobachtbar macht. Dem Puffer ist 1 µg/ml Ethidiumbromid beigegeben, so daß das Fragmentmuster nach beendetem Lauf (ca. acht Stunden) im UV-Durchlicht photographisch festgehalten werden kann.

C) ERGEBNISSE

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit lag bereits ein genetische Karte der OXI3-Region von geringerem Umfang aus einer anderen Arbeitsgruppe vor (43). Die dafür verwendeten Mutanten unterscheiden sich in der Konstitution des mitochondrialen Genoms von den Stämmen, die für die vorliegende Kartierung herangezogen wurden; letztere baut auf Vorarbeiten am hiesigen Institut auf, die bereits publiziert sind (63).

1.) Genetische Feinstrukturanalyse der OXI3-Region

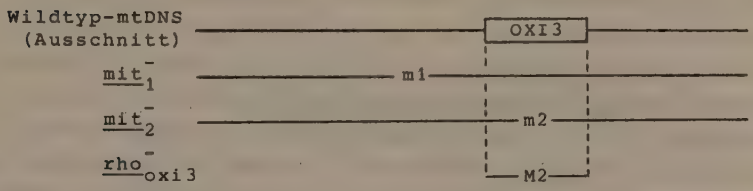
1.1.) Induktion und Isolierung von mit⁻Mutanten der OXI3-Region

Zellen des Stammes 777-3A (op1), dessen mitochondriales Genom sich im Wildtyp-Zustand befindet, wurden mit Manganchlorid behandelt, einem Mutagen, das nach neueren Untersuchungen (96) mit einer in der inneren Mitochondrienmembran lokalisierten DNase interagiert und atmungsdefekte Mutanten vom rho⁻- wie auch vom mit⁻-Typ erzeugt, jedoch nicht zu entsprechenden Mutanten des Kerns zu führen scheint (83).

Da die Kernmutation op1 Lethalität von rho⁻Mutanten bewirkt (87), sind unter den vom Stamm 777-3A (op1) abgeleiteten atmungsdefekten Mutanten nur solche vom mit⁻-Typ zu erwarten (64). Um nun der durch mutagene Behandlung angereicherten Population von atmungsdefizienten Mutanten diejenigen zu identifizieren, deren Defekt innerhalb der OXI3-Region liegt, wurde ein geeignetes genetisches Testsystem aus verschiedenen, bereits charakterisierten rho⁻Stämmen zusammengestellt, deren mitochondriale Restgenome die OXI3-Region ganz oder teilweise enthalten. In

Kreuzungen dieser rho^-_{oxi3}-Stämme mit der Kollektion der mit^--Mutanten bilden nur die darin enthaltenen mit^-_{oxi3}-Mutanten, welche auch fähig sind, auf Glycerin-Medium zu wachsen (s.Abb.5):

Abb.5: Schema zur Isolierung der mit^- mit Atmungsdefekt in der OXI3-Region mit Hilfe geeigneter rho^--Testerstämme:



Das hier verwendete genetische Selektionssystem zielt auf eine Differenzierung zwischen solchen atmungsdefekten Mutanten, die außerhalb (mit^-_1) und solchen, die innerhalb (mit^-_2) der OXI3-Region liegen. Rekonstitution der Atmungsfähigkeit ist nur bei der Mutante mit^-_2 möglich, deren Mutationsort m2 im Bereich des rho^-_{oxi3}-Genoms liegt, welches den mutierten Marker M2 im Wildtypzustand zurückbehalten hat.

Das Ergebnis dieser Mutantensuche zeigte, daß der Anteil von mit^-_{oxi3}-Mutanten an den insgesamt gefundenen atmungsdefekten Stämmen beträchtlich ist und 50% - 60% beträgt, eine Beobachtung, die auch von anderen Autoren gemacht wurde (43, 63).

Aus mehreren Versuchsansätzen wurden insgesamt 231 mit^-_{oxi3}-Mutanten gewonnen; die mit dem Präfix 'M'bzw. 'MA...MH' gekennzeichneten Serien wurden mit Hilfe des Mutagens Mangan-

chlorid induziert, die kleinere U-Serie durch Bestrahlung mit UV-Licht (85). Die Zuordnung von Nummern zu den Stämmen erfolgte willkürlich nach der Reihenfolge ihrer Isolierung, so daß nummerische Ähnlichkeiten nichts über tatsächliche Verwandtschaftsbeziehungen der Mutanten besagen.

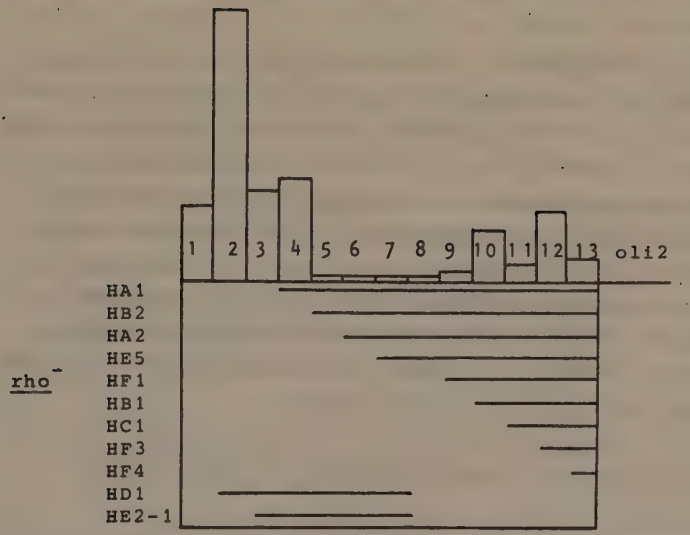
Circa 30% der $\underline{mit}^-_{oxi3}$Mutanten zeigen spontan Reversion und diese scheinen relativ gleichmäßig über die OXI3-Region verteilt zu sein (vgl.Tab.2, S.53). Die sich in Wachstum auf nicht-vergärbarem Substrat manifestierende Reversibilität bestimmter $\underline{mit}^-$Mutanten hat möglicherweise die molekulare Grundlage, daß die den Atmungsdefekt verursachende Mutation auf der Substitution eines einzelnen Basenpaares beruht. Die Aufhebung eines solchen Mutationsschritts (Reversion) kann dann mit der gleichen, relativ großen Wahrscheinlichkeit erfolgen, mit welcher die Entstehung der Mutation vonstatten ging. Mit zunehmender Zahl der Basenpaare, die durch das mutative Ereignis substituiert oder deletiert sind, wird die Wahrscheinlichkeit einer Rückmutation geringer, was dann als unterschiedliche Reversionsneigung in Erscheinung tritt.

1.2.) Erste Retentionskartierung

Das Resultat des Kreuzungsexperiments, welches als erstes durchgeführt wurde - 130 $\underline{mit}^-_{oxi3}$Stämme waren mit Hilfe von zwölf verschiedenen $\underline{rho}^-$Mutanten in 13 Gruppen einteilbar (Abb.6) - bot ein überraschendes Bild: 60% der untersuchten $\underline{mit}^-$Marker kartierten in den ersten drei Gruppen des PAR-proximalen Bereichs der OXI3-Region. Sie wurden von keiner oder nur wenigen $\underline{rho}^-_{oxi3}$Mutanten rekonstituiert:

Gruppe 1: 14 $\underline{mit}^-$Marker - durch keine $\underline{rho}^-$Mutante erfolgte Rekonstitution.

Abb. 6: Ergebnis des ersten Kreuzungsexperimentes mit⁻ x rho⁻:



Die waagerechten, durchgezogenen Linien zeigen den Retentionsbereich der verwendeten rho⁻Stämme innerhalb der OXI3-Region an. Die vertikalen Säulen stellen die mit⁻$_{oxi3}$Gruppen dar (1 bis 13), wobei die verschiedenen Höhen die relative Häufigkeit der Mutanten, die in einer Gruppe kartieren, andeuten. 60% der mit⁻Mutanten fallen in die Gruppen 1 - 3.

Gruppe 2: 51 mit⁻Marker - Rekonstitution nur durch rho⁻HD1.

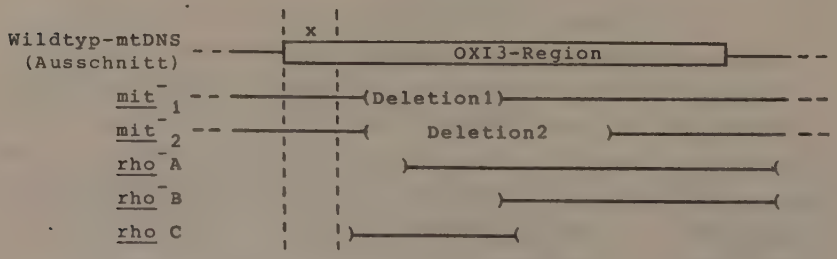
Gruppe 3: 17 mit⁻Marker - Rekonstitution durch rho⁻HD1 und HE2-1.

Dieses Phänomen gab Anlaß zu der Überlegung, ob in diesem Bereich der OXI3-Region ein "hot spot" für mutative Ereignisse vorliegen könnte, der von keinem der verfügbaren rho⁻-Typen weiter aufgetrennt werden kann. (Erste Erklärungsmöglichkeit).

In diesem Zusammenhang war auffällig, daß die Mehrzahl der rho⁻Stämme mtDNS-Sequenzen zurückbehalten haben, die von dem OLI2-nahen Bereich her unterschiedlich weit in die OXI3-Region hineinreichen. Die einzigen Ausnahmen in dieser Beziehung stellen die beiden rho⁻Mutanten HD1 und HE2-1 dar (Abb.6).

Neben der Möglichkeit, daß bislang die entsprechenden rho⁻-Typen für eine weitere genetische Differenzierung der "hot spots" noch nicht gefunden waren oder prinzipiell nicht auftreten, war noch eine weitere Erklärung für das Erscheinen der mit⁻Marker-akkumulierender Gruppen denkbar: Wenn sich nämlich unter diesen mit⁻Mutanten welche befinden sollten, deren mitochondriales Genom selbst einen größeren Teil der OXI3-Region durch Deletion verloren hat, kann dieser Defekt bestenfalls bei Kreuzung mit solchen rho⁻Stämmen kompensiert werden, deren mtDNS diese deletierte Sequenz zurückbehalten haben (Abb.7):

Abb. 7: Skizze zur Kreuzung von mit⁻Δ x rho⁻Mutanten



Durchgezogene Linien: Die von den Mutanten zurückbehaltenen mtDNS-Sequenzen; die deletierten Bereiche liegen zwischen den offenen Klammern. Nur rho⁻C kann die Atmungsfähigkeit einer mit⁻Δ1 Mutante wiederherstellen. Mutante mit⁻Δ2, als Punktmutante interpretiert, würde bei der Kreuzungsanalyse (mit⁻ x rho⁻) im Bereich 'x' der OXI3-Region lokalisiert - vgl. Situation in Abb.6).

Solche mit⁻Deletionsmutanten (mit⁻Δ) können mit Hilfe einer qualitativen Rekombinationsanalyse aufgespürt werden, wie das im weiteren ausgeführt ist (1.3.).

1.3.) Qualitative Rekombinationsanalyse

Zur Prüfung, ob bei den erwähnten mit⁻Mutanten (1.2.) Deletionen von größerem Ausmaß innerhalb der OXI-Region vorliegen, mußte für die dazu nötigen Kreuzungen vom Typ mit^-_y x mit^-_z zunächst der größte Teil der verfügbaren $mit^-_{oxi\,3}$Stämme in den alternativen Paarungstyp überführt werden. Dies geschah unter Verwendung der Kernfusionsmutante IC8/AA1 bei modifizierter Anwendung der "Cytoductions"-Methode von LANCASHIRE & MATTOON (89).

Jeder der 231 $mit^-_{oxi\,3}$Stämme (Paarungstyp α) wurde jeweils gegen einen repräsentativen Testsatz, bestehend aus mindestens einer mit⁻Mutante (Paarungstyp a) pro Gruppe 1 bis Gruppe 13 der Retentionskarte (Abb.6) gekreuzt - insgesamt wurden hierfür mehr als 30 000 Einzelkreuzungen durchgeführt.

Im Folgenden soll die Kreuzungsanalyse bei der qualitativen Rekombinationsanalyse erläutert werden:
Bei Kreuzung zweier nicht-identischer mit⁻Punktmutanten ist in der Nachkommenschaft die Entstehung von Wildtyp-Rekombinanten zu erwarten (vgl.S.6, Abb.2-2), die sich auf nicht-vergärbarem Substrat als wachsende Diploide manifestieren. Zeigt folglich eine bestimmte mit^-_A, gekreuzt gegen einen Satz Punktmutanten mit^-_B bis mit^-_Z, auf Glycerin-Medium mit allen Testerstämmen Wachstum, kann geschlossen werden, daß der Atmungsdefekt der mit^-_A selbst auf eine Punktmutation zurückzuführen ist. Beispiele für Kreuzungsergebnisse dieses Typs sind in Abb.8-a zusammengefaßt.

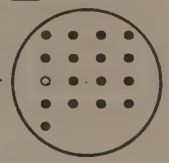
Nun ist aber auch zu beobachten, daß auf manchen Glycerin-Platten die gegen eine Serie von Punktmutanten getesteten mit⁻Stämme nur einen Teil ihrer Tester rekonstituieren können: Mit den Mutanten der lateralen OXI3-Gruppen bilden sie auf YG-Platten je eine zusam-

Abbildung 8 : Kreuzungsanalyse bei der qualitativen Rekombinationsanalyse

8-a) Kreuzungsmuster von mit⁻ Punktmutanten

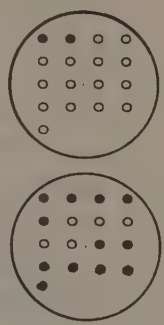
a \ α	M 6412	M 7171	M 2571	M 6415	M 7342	M 7811	M 2631	M 1702	M 4204	M 7962	M 2131	M 4228	M 4984	M 4210	M 6364	M 2352	M 7471
M 6412	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 7171	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 2571	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 6415	+	+	+	-	e	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 7342	+	+	+	e	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 7811	+	+	+	+	e	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 2631	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 1702	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M 4204	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
M 7962	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
M 2131	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
M 4228	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M 4984	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
M 4210	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
M 6364	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
M 2352	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
M 7471	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-

Koloniemuster auf YG-Platten



8-b) Kreuzungsmuster von mit⁻ Deletionsmutanten

a \ α	M 3001	M 4363	M 7984	M 2561	M 4911	M 4917	M 2613	M 4021	M 2932
M 3001	e	-	-	-	-	-	-	-	-
M 4363	e	-	-	-	-	-	-	-	-
M 7984	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M 2561	+	+	-	-	-	-	-	-	-
M 4911	+	+	+	-	-	-	-	-	-
M 4917	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M 2613	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M 4021	+	+	+	+	-	-	-	-	-
M 2932	+	+	+	+	+	+	-	-	-



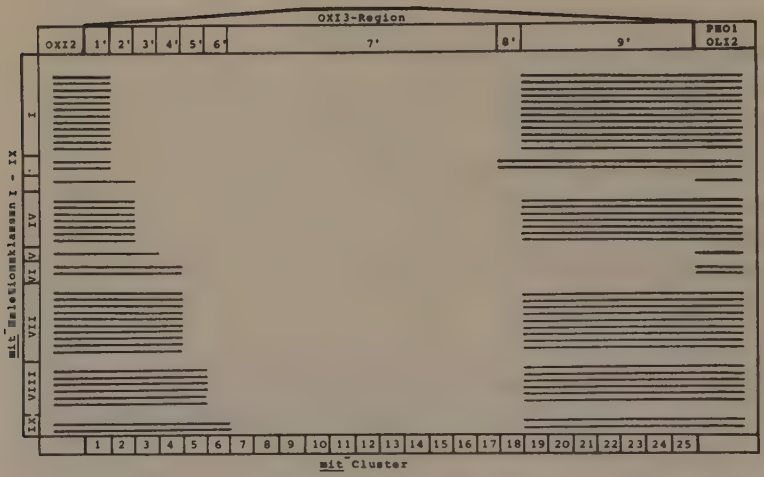
menhängende Reihe wachsender Rekombinanten-Kolonien, während sie mit mehreren der innerhalb der OXI3-Region kartierenden Mutanten keine Rekombinanten bilden (Abb.6-b). Da mit der gruppenweisen Festlegung der Testermutanten in der vorausgegangenen Retentionskartierung deren Aufeinanderfolge relativ genau etabliert war, läßt sich der Umfang der deletierten mtDNS-Sequenzen genetisch als Bereich nicht-rekonstituierbarer mit⁻ Marker bestimmen.

Die aus den Kreuzungsanalysen als mit⁻ Deletionsmutanten identifizierten Stämme, - von 231 mit^-_{oxi3} Mutanten tragen 43 Deletionen, das sind ca. 20% - konnten entsprechend der unterschiedlich großen Deletionsbereiche ihrer mtDNS in neun verschiedene Typen eingeteilt werden (siehe Abb.9-b).

Was den Ausgangspunkt der qualitativen Rekombinationsanalyse betrifft, bleibt zweierlei festzustellen:
Zum einen erwies sich ein Großteil der in den mit⁻ Gruppen 1 bis 3 angehäuften mit⁻ Stämme als Deletionsmutanten. Zum anderen konnten die mit⁻ Gruppen 1 und 2 erheblich besser aufgelöst werden, da die mit⁻ Deletionsmutanten selbst durch ihr Vermögen, unterschiedliche mit⁻ Markergruppen zu rekonstituieren, in diesem Bereich eine genauere Karteneinteilung möglich machte (Abb. 9-a).

Dennoch blieben Mutanten-Gruppen mit größeren Anhäufungen von mit⁻ Markern bestehen (z.B. Gruppe 3 in Abb.9-a), deren weitere Differenzierung durch die Isolierung zusätzlicher rho⁻ Typen versucht werden sollte.(1.4.)

Abb.9 : Ergebnisse der mit⁻Deletionskartierung

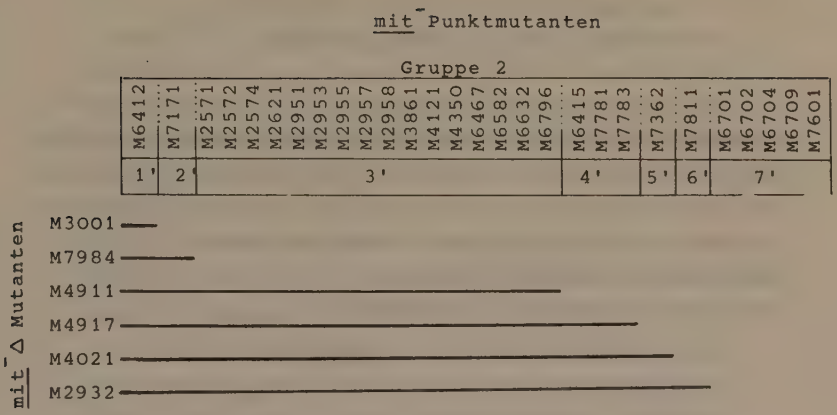


9-a) Horizontal oben: Die OXI3-Region (zwischen den flankierenden Regionen: OXI2 und PHO1/OLI2) mit den durch die mit⁻Deletionsmutanten differenzierbaren Gruppen von mit⁻Punktmutanten 1' bis 9'. Der Fortschritt in der Auflösung der Karte, den diese Kartierungsmethode gewährte, wird bezeichnet durch die Tatsache, daß die mit⁻Gruppe 2 (rho⁻Karte in Abb.6, S.27) in sieben Untergruppen aufgetrennt werden konnte; vgl. dazu Skizze in Abb. 9-b.

Horizontal unten: Zuordnung der mit⁻Cluster (1-25) der genetischen Gesamtkarte (Kombination der Daten aus rho⁻ und mit⁻Deletionskartierung, Abb.11) zu den Gruppen in dieser Karte.

Vertikal: mit⁻Δ-Klassen I - IX. Die von den Mutanten zurückbehaltenen mtDNS-Bereiche sind durch horizontale Linien gekennzeichnet.

9-b



Im oberen Teil der Abbildung ist die Gruppe 2 der mit⁻ Punktmutanten (M6412 bis M7601) gezeigt, die durch rho⁻ Kartierung zustandegekommen ist (vgl.Abb.6, S.27). Die durch Linien (—·····) angezeigte Unterteilung in die Untergruppen 1' bis 7' demonstriert die Leistung der mit⁻ Deletionskartierung bei der weiteren Auflösung der Mutanten zu einer differenzierten Karte. Die schwarzen, horizontalen Balken repräsentieren zurückbehaltene mtDNS-Segmente der OXI3-Region (OXI2-proximaler Bereich) der mit⁻ Δ Mutanten M3001 bis M2932.

1.4.) Isolierung und Subklonierung von rho⁻Mutanten der OXI3-Region

Nach Induktion von rho⁻Mutanten unter Verwendung des mutagenen Agens Manganchlorid in einem vom Wildtyp-Stamm KL 14-4A abgeleiteten Subklon (SUCHY, i.Vb.), wurden aus den in diesem Ansatz gewonnenen rho⁻Mutanten diejenigen isoliert, deren zurückbehaltenes Genomsegment die OXI3-Region ganz oder teilweise beinhaltet. Dazu wurde ein mehrstufiges Testsystem verwendet:

- Zuerst wurden alle diese rho⁻Stämme gegen drei bekannte mit⁻Mutanten der OXI3-Region gekreuzt; rekonstituierte die rho⁻eine oder zwei der drei atmungsdefekten Testmutanten, so wurde daraus auf eine nur teilweise Retention der OXI3-Region geschlossen und diese rho⁻ für eine genauere Untersuchung isoliert.
- Diese als rho^-_{oxi3} identifizierten Mutanten wurden dann zur näheren Charakterisierung gegen je einen Repräsentanten der 13 bekannten mit⁻Gruppen (vgl. Abb.6) gekreuzt. Diesem noch groben Raster entsprechend konnten die rho⁻Mutanten in verschiedene Typen eingeteilt werden (unter Mitarbeit von Herrn SUCHY).
- Um zu prüfen, ob neue rho⁻Typen vorliegen, wurde jede rho⁻Mutante gegen alle verfügbaren mit⁻Marker derjenigen Gruppen getestet, in die ihr Restgenom an beiden Enden noch hineinreicht; so konnte untersucht werden, ob Gruppen, welche aus mehreren mit⁻Mutanten bestehen, durch diese rho⁻Typen in weitere Untergruppen aufgetrennt werden können.
- Um eine zusätzliche Auflösung wenig differenzierter Kartenbereiche zu ermöglichen, wurden bestimmte rho⁻Stämme subkloniert:

Auf eine YD-Platte werden in geeigneter Verdünnung (ca. 50 Kolonien pro Platte sollen heranwachsen) Zellen einer rho⁻Mutante mit der Impföse aufgetragen, verteilt und sodann bei 30°C fünf Tage bebrütet. Anschließend konnte dann das Koloniemuster der hochgewachsenen rho⁻Klone auf verschiedene YG-Platten mit je einem mit⁻Rasen abgestempelt werden: Als mit⁻Tester waren jeweils diejenigen ausgewählt worden, die von dem Ausgangs-rho⁻Stamm an den Rändern von dessen Genomsegment noch rekonstituiert worden waren.

mit⁻Tester für die Randmarker						Ausgangsstamm rho⁻ I	1 2 3 4.....47 48 49 50
1	2	3	48	49	50		
-	-	+	+	+	+	Subklon I-a	3 4.....47 48 49 50
+	+	+	+	+	-	Subklon I-b	1 2 3 4.....47 48 49
-	+	+	+	-	-	Subklon I-c	2 3 4.....47 48

So konnte geprüft werden, ob und wie weit die mtDNS der rho⁻Mutante verkürzt wurde.

In denjenigen Fällen, in denen neue rho⁻Typen festgestellt werden konnten, wurden diese Stämme isoliert und daraufhin gegen den kompletten Satz der mit^-_{oxi3} Stämme gekreuzt. Die aus spontaner Subklonierung hervorgegangenen Stämme sind dadurch in der Nomenklatur gekennzeichnet, daß an die Stammbezeichnung des Ausgangs-rho⁻Klons ein durch einen Bindestrich verbundenes Suffix angehängt wurde.

Von Interesse erscheint in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß die Rate, mit der bei spontaner Subklonierung kürzere rho⁻Genome entstehen, von Stamm zu Stamm er-

heblich variiert. Diese Variationsbreite - von 0,1% bis ca. 50% - scheint jedoch nicht mit der Länge des mitochondrialen Restgenoms korreliert zu sein. Weiterhin konnte in diesen Untersuchungen festgestellt werden, daß - ebenfalls stammspezifisch - die zur rho$^-$ Bildung führende Instabilität des mitochondrialen Genoms sehr häufig auch zu dessen Gesamtverlust führt; die Rate, mit der solche als rho^0 bezeichneten, mtDNS-losen Klone in einer Population von rho$^-$ erscheinen, schwankt zwischen ca. 15% (BM1-su2) und 99% (HK6).

1.5.) Retentionskartierung (rho^-_y x mit^-_z)

Die im Vergleich zu der unter 1.2.) (S.26f.) erwähnten ersten Retentionskartierung erweiterte Kollektion an rho$^-_{oxi3}$ Mutanten wurde gegen die Gesamtheit der verfügbaren mit$^-_{oxi3}$ Punktmutanten gekreuzt (als Punktmutanten werden hier etwas ungenau alle diejenigen mit$^-$ Stämme bezeichnet, die sich in der qualitativen Rekombinationsanalyse (1.3.), S.29) nicht als Deletionsmutanten erwiesen; dies schließt jedoch nicht aus, daß sich unter jenen nicht auch Stämme mit zunächst nicht erfaßten Minideletionen befinden). Gemäß dem bereits beschriebenen Prinzip (siehe S.16) wurde aus den Ergebnissen der Kreuzungsanalyse eine genetische Karte der OXI3-Region erstellt:

Die unterschiedlichen, einander überlappenden mtDNS-Segmente der rho$^-$ Mutanten ermöglichte die Feststellung der mit$^-$ Marker in einer linearen Abfolge, wie sich umgekehrt die rho$^-$ in ihrer "Länge" durch die Anzahl der mit$^-$ Marker, welche ihr Genom rekonstituieren kann, definieren.

Auf diese Weise konnten 154 rho$^-$ Stämme in 27 verschiedene Klassen eingeteilt werden. In einige dieser Klassen (Abb.10, Klasse I, IX, X, XIV und XXIII) fällt eine Vielzahl einzelner, gemäß der genetischen Charakterisierung glei-

cher rho⁻. Diese Anhäufung mancher rho⁻Typen kann eine der folgenden Ursachen haben:

1. Die Auflösungsgenauigkeit der Methode (d.h. die Dichte der mit⁻Marker in dem fraglichen Bereich der mtDNS) ist zu gering, um tatsächlich vorhandene molekulare Unterschiede dieser in einer Klasse zusammengefaßten rho⁻Stämme sichtbar machen zu können.

2. Bei der Isolation von rho⁻Mutanten (1.4.) traten zufällig mehrere Kolonien, die aus dem gleichen Klon stammen, d.h. auf das selbe Mutationsereignis zurückzuführen sind, als getrennte Einzelkolonien auf und wurden so für voneinander unabhängig entstandene Mutanten gehalten. So wenig diese Möglichkeit bei dem angewendeten Selektionsverfahren generell ausgeschlossen werden kann, muß dagegen , als alleinige Erklärung, gehalten werden, daß auch bei rho⁻Mutanten, die aus verschiedenen Induktionsansätzen gewonnen wurden, bestimmte Typen regelmäßig mit größerer Häufigkeit auftreten. Die auffälligste Anhäufung von ca. 30% aller charakterisierten rho⁻Mutanten wird in der Klasse IX (Abb.10) gefunden. Ihre Mitgleider leiten sich aus zwei unabhängig induzierten rho⁻Serien her: Neben der in dieser Arbeit hauptsächlich untersuchten HK-Serie steht die rho⁻HF1 als Repräsentant der in einer früheren Arbeit (63) gezeigten Serie, in welcher der selbe rho⁻Typ als häufigster auftrat. Entsprechendes gilt auch für die rho⁻Klasse X.

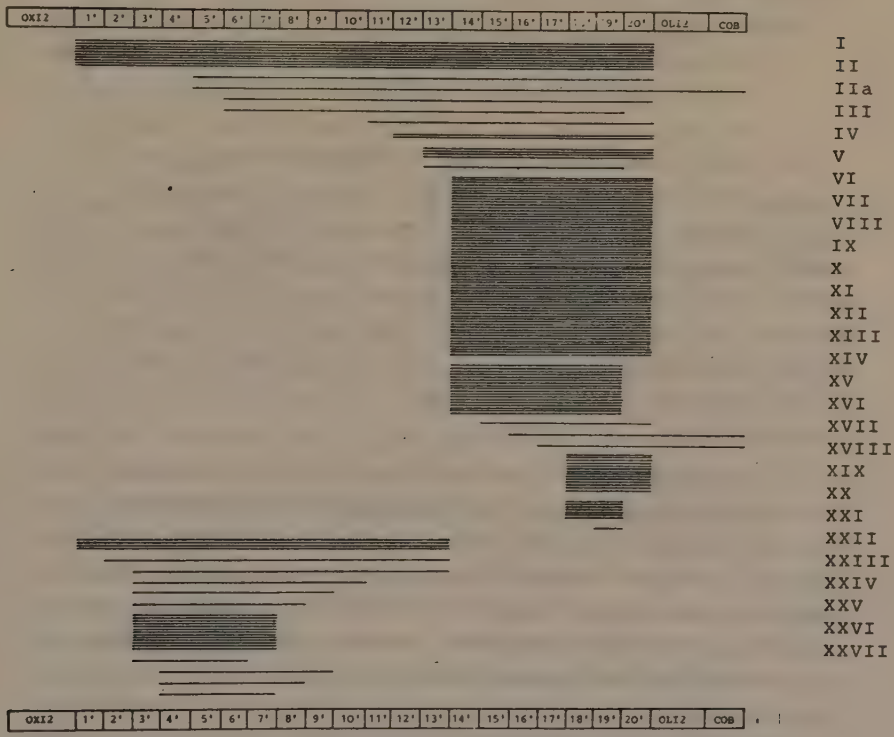
3. Es gibt präferentielle Deletionsentstehungsorte innerhalb der OXI3-Region. Diese Annahme wird zum einen durch den Befund nahegelegt, daß nicht nur die Deletionen der rho⁻Klassen IX, X, XVII, XVIII und XIX alle im Bereich zwischen den mit⁻Markern M7181 und M2131 beginnen, son-

dern auch diejenigen der meisten mit⁻ Deletionsmutanten (Abb.9-b).; das betrifft somit insgesamt ca. 50% aller bekannten Deletionen in der OXI3-Region. Dazu kommt, daß in jüngster Zeit von verschiedenen Autoren deutliche Hinweise für eine Beteiligung definierter DNS-Sequenzen an der Entstehung von Deletionen, insbesondere auch bei verschiedenen rho⁻ Stämmen von Saccharomyces cerevisiae, erbracht werden konnten (97- 99).
Zwar machen die genetischen Daten das Vorhandensein solcher Sequenzen als Grund für das bevorzugte Auftreten bestimmter rho⁻ Klassen plausibel, doch läßt sich eine letztliche Klärung nur durch eine Sequenzanalyse, die auf Daten einer physischen Kartierung aufbaut, erreichen.

Wie Abbildung 10 anschaulich demonstriert, reicht die überwiegende Mehrzahl der rho⁻ Genome (Klasse I bis XVI) ausschließlich vom OLI2-nahen Bereich her unterschiedlich weit in die OXI3-Region hinein; nur die Vertreter der Klassen XVII bis XXVII bilden davon eine Ausnahme. Diese Asymmetrie der Verteilung deutet darauf hin, daß bei der rho⁻ Bildung bestimmte Sequenzen für das Überleben der Restgenome von größerer Bedeutung als andere sind und offensichtlich einen Selektionsvorteil genießen. Innerhalb der OXI3-Region lassen sich zwei Abschnitte ausmachen, die jeweils allen rho⁻ Klassen gemeinsam sind: Der Bereich der mit⁻ Gruppe 19' ist bei allen rho⁻ Typen der Klassen I bis XVI, der Bereich der Gruppen 4' bis 6'bei den Klassen XVII bis XXVIIerhalten (Abb.10). Ähnliche Beobachtungen über bevorzugte Retention bestimmter mtDNS-Abschnitte wurden auch von anderen Autoren gemacht und als mögliche 'origin'-Bereiche der Replikation interpretiert (100).

Da einige der untersuchten rho⁻ Mutanten Sequenzen der mtDNS über die OXI3-Region hinaus bis in den benachbarten Teil des COB-Genes zurückbehalten haben (die Klassen IIa,

Abb. 10 : rho⁻ Retentionskarte der OXI3-Region



Mit Hilfe von rho⁻ Deletionsmutanten, die verschiedene Teilabschnitte der OXI3-Region zurückbehalten haben (hier entsprechend genetisch gleicher Genomgröße zu den Klassen I - XXVII geordnet), ließen sich die mit⁻ Punktmutanten in separate Gruppen (1' - 20') einteilen. Diese Gruppen sind als numerierte Kästchen gekennzeichnet, die Restgenome der Deletionsmutanten als horizontale Linien. Zur Kartierungsmethode vgl. S.4f.; weitere Erklärungen im nebenstehenden Text.

XII und XIII), - wie durch geeignete mit⁻Testerstämme geprüft - ist eine Orientieung der mit⁻Gruppen in Bezug auf die anderen Regionen der mtDNS möglich:

OXI2 - Gruppe 1' - ... - Gruppe 20' - COB (vgl.Abb.1)
OXI3

Wie schon erwähnt, fällt die Einteilung der rho⁻ Mutanten mit der Zuordnung der mit⁻Marker zu verschiedenen Gruppen zusammen; die 188 untersuchten mit^-_{oxi3} Stämme kartieren in zwanzig separaten Gruppen(Abb.10). Dabei bleibt eine gewisse Ungleichmäßigkeit in der Verteilung der mit⁻Marker erhalten, wie sie schon bei der ersten Retentionskartierung beobachtet worden war (s.S.26). Dieses Phänomen soll weiter unten noch ausführlich behandelt werden.

Voraussetzung für eine widerspruchsfreie Einordnung der Kreuzungsdaten in der rho⁻Retentionskartierung ist das Vorhandensein von kontinuierlichen mtDNS-Segmenten der rho⁻. Da eine solche Einordnung im vorliegenden Fall ohne Ausnahme möglich war, ist zu schließen, daß interne Deletionen oder Rearrangements innerhalb der rho⁻Genome, wie sie von anderen Autoren erwähnt wurden (101), nicht oder doch nur selten existieren und im genetischen Test nicht nachweisbar waren.

Eine naheliegende Erklärung für diese unterschiedlichen Befunde wäre die, daß die einmal induzierten rho⁻Klone nach Ablauf vieler Generationen zunehmend anfälliger für das Eintreten der genannten Veränderungen werden. In den Kreuzungsversuchen der vorliegenden Arbeit folgten die genetischen Tests jedenfalls rasch auf die Induktion der rho⁻Klone.

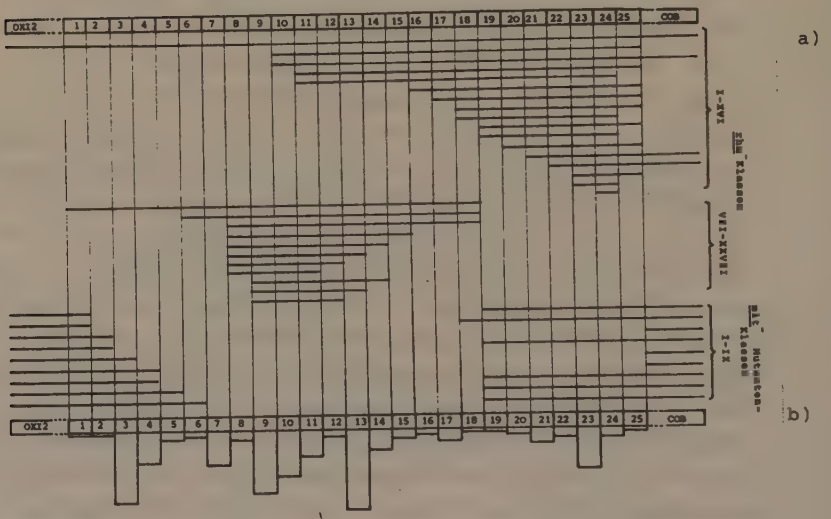
Zusammenfassung der Ergebnisse der rho⁻Retentionskartierung und der qualitativen Rekombinationsanalyse:

In den Kapiteln 1.3.) und 1.5.) wurden die beiden Ansätze für eine genetische Feinkartierung der OXI3-Region dargestellt. Zweck dieser Experimente war es, die Reihen-

folge der mit^-_{oxi3} Marker auf der mtDNS möglichst genau zu bestimmen. Als Ergebnis der qualitativen Rekombinationsanalyse wurde, wie in Abb.9-b festgehalten (s.S.32), eine Differenzierung in neun mit^- Gruppen erzielt. Kombiniert man diese Daten mit denen der rho^- Retentionskartierung (Abb.10: 20 Gruppen), so lassen sich 25, im weiteren als Cluster bezeichnete, Gruppen unterscheiden:Die Abb.11-a zeigt diese genetische Karte der OXI3-Region.

Der Abb. 11-b ist die weiterhin bestehende, ungleichmäßige Verteilung der mit^- Marker auf die einzelnen Cluster zu entnehmen. Die Frage, wie die signifikant überdurchschnittlichen Anhäufungen in den Clustern 3, 9, 10, 13 und 23 (im statistischen Mittel wären 7,5 mit^- Marker pro Cluster zu erwarten) zu erklären sind, läßt sich nicht mit Sicherheit beantworten. Zum einen ist denkbar, daß es Bereiche innerhalb der OXI3-Region gibt, die aufgrund ihrer Basenkonstitution eine stärkere Mutabilität aufweisen (vgl. dazu (102)). Die "hot spots" können aber auch besonders "sensitive" Genbereiche markieren, innerhalb von denen Mutationen nicht tolerabel sind, da sie Aminosäurepositionen codieren, welche im zugehörigen Polypeptid funktionell besonders wichtig sind. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß das Verteilungsmuster von Mutationen im allgemeinen auch mutagenspezifische Unterschiede aufweist (103). Eine andere, ebenso plausible Erklärung wäre es, anzunehmen, daß in bestimmten Bereichen keine Deletionen entstehen können oder nur mit geringer Wahrscheinlichkeit und somit vermittels der angewandten Kartierungsmethoden innerhalb bestimmter Cluster keine weitere Differenzierung zu erreichen war. Solange jedoch keine quantitativen Bestimmungen der Lagebeziehungen der Mutationsorte vorliegen, die Auskunft geben könnten, ob sich die jeweilige Zahl von mit^- Markern eines Clusters auf eine mehr oder weniger große Sequenz der mtDNS verteilt, müssen die Erklärungen dieses Phänomens spekulativ bleiben. Ein Ansatz in diese Richtung ist die quantitative Rekombinationsanalyse.

Abb.11 : Genetische Karte der OXI3-Region, erstellt aus einer Zusammenfassung der Ergebnisse von Retentions- und Deletionskartierung (vgl. Abb. 9 und 10).



11-a: Die horizontalen, durchgezogenen Linien beschreiben die von den Deletionsmutanten (rho⁻ und mit⁻ Δ) zurückbehaltenen Bereiche der OXI3-Region. Aufgrund der unterschiedlichen Grössen der Restgenome dieser Mutanten können die mit⁻ Punktmutanten zu insgesamt 25 Clustern (horizontale, numerierte Kästchen) zusammenfassen.

11-b: Die von der Kästchenreihe (25 Cluster) nach unten reichenden weißen Säulen sollen die zahlenmäßig unterschiedlich großen Anhäufungen von unabhängig isolierten Punktmutanten pro Cluster veranschaulichen. Den auffälligsten "hot spot" zeigt Cluster 13, mit 28 mit⁻ Mutanten.

1.6.) Quantitative Rekombinationsanalyse

Die Erstellung von Genkarten aus beobachteten Rekombinationshäufigkeiten geht davon aus, daß das Auftreten eines Rekombinationsereignisses zwischen zwei Mutationsorten um so wahrscheinlicher ist, je weiter diese voneinander entfernt liegen. Die Rekombinationsfrequenz bei Kreuzungen vom Typ $\underline{mit}^-_y$ x $\underline{mit}^-_z$, bestimmt als prozentualer Anteil von Wildtyp-Rekombinanten ($\underline{mit}^+$) an der Gesamtzahl der gewachsenen Kolonien, erreicht einen theoretischen Höchstwert von 12,5% (104)

Zunächst wurden fünf über die OXI3-Region verteilte Mutanten-Positionen ausgewählt:
M2571 (C3), M2661 (C9), M4051 (C13), M2131 (C18) und M4191 (C23). Diese Mutanten waren dann jeweils Bezugspunkte für Kreuzungen gegen einen Satz weiterer $\underline{mit}^-_{oxi3}$Mutanten. Die für die Bildungsraten an Wildtyp-Rekombinanten gefundenen Werte bewegten sich zwischen 0,0% und 8,9%. Die einzelnen Daten fügen sich, wie die Abb.12 zeigt, in den durch die bereits etablierte Karte (vgl.Abb.11) vorgegebenen Rahmen ohne Widersprüche ein. Die Werte der reziproken Kreuzungen - im Folgenden zusammengestellt - differieren nur im Bereich der zu erwartenden statistischen Schwankungen:

M2571 x M2661 = 4,0%
M2661 x M2571 = 5,9%

M2571 x M4051 = 5,8%
M4051 x M2571 = 4,9%

M2571 x M2131 = 7,3%
M2131 x M2571 = 6,2%

M2571 x M4191 = 8,9%
M4191 x M2571 = 8,5%

M2661 x M2131 = 5,6%
M2131 x M2661 = 5,0%

M2661 x M4191 = 8,7%
M4191 x M2661 = 7,3%

M4051 x M2131 = 3,7%
M2131 x M4051 = 3,5%

M4051 x M4191 = 5,3%
M4191 x M4051 = 4,7%

M2131 x M4191 = 2,7%
M4191 x M2131 = 2,6%

Weiterhin ist zu beobachten, daß bei einer Markersequenz a - b - c die Summe der Rekombinationshäufigkeiten (a x b) + (b x c) größer ist, als der entsprechende Wert

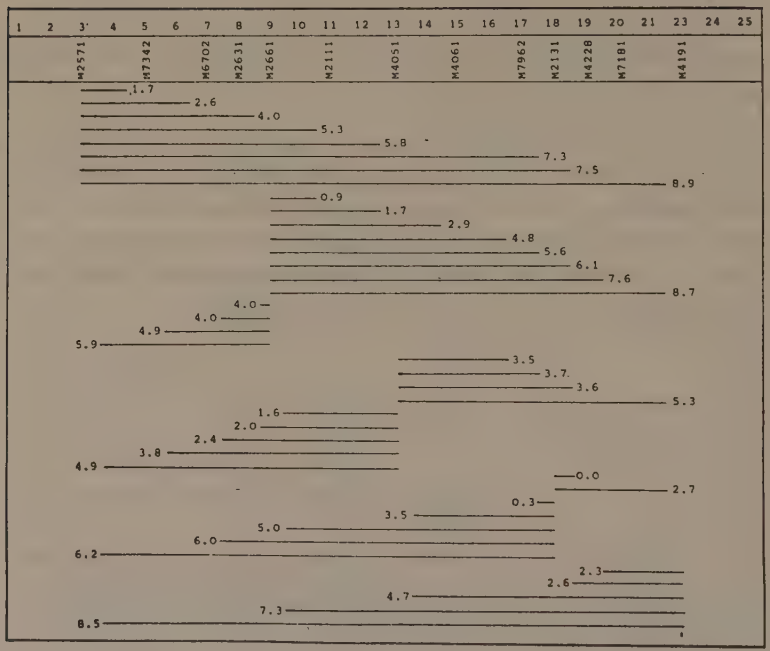
aus der Kreuzung (a x c), also negative Interferenz vorliegt. Als Ursache hierfür kann das Auftreten mehrfacher Rekombinationen zwischen distalen Markern angesehen werden, die phänotypisch zu Parentaltypen (mit⁻) führen, deren Austauschereignisse also nicht sichtbar werden. Dadurch ist die Beziehung von Rekombinantenrate und der Entfernung der zugehörigen Marker nicht linear; "Additivität" ist daher hinreichend gegeben, wenn - wie im vorliegenden Fall erfüllt - der Wert aus (a x c) größer ist, als jeder der Werte aus den Einzelkreuzungen (a x b), (b x c). Bemerkenswert ist, daß der gefundene MAximalwert der Rekombinantenrate nicht über 9% hinausreicht.

B1	M2571	x	M2661	x	M2111	= 6,8%
	M2571		x		M2111	= 5,3%
B2	M2571	x	M2661	x	M4051	= 7,6%
	M2571		x		M4051	= 4,9%
B3	M2571	x	M2661	x	M2131	=11,5%
	M2571		x		M2131	= 6,2%
B4	M2571	x	M4051	x	M2131	= 8,6%
	M2571		x		M2131	= 7,3%
B5	M2571	x	M4051	x	M4228	= 8,5%
	M2571		x		M4228	= 7,5%
B6a	M2571	x	M2661	x	M4191	=14,6%
b	M2571	x	M4051	x	M4191	=10,2%
c	M2571	x	M2131	x	M4191	= 8,9%
	M2571		x		M4191	= 8,9%
B7	M6702	x	M2661	x	M2131	= 9,6%
	M6702		x		M2131	= 6,0%
B8	M6702	x	M4051	x	M2131	= 6,1%
	M6702		x		M2131	= 6,0%
B9	M2661	x	M4051	x	M2131	= 5,1%
	M2661		x		M2131	= 5,0%
B10	M2661	x	M4051	x	M4228	= 5,2%
	M2661		x		M4228	= 6,1%
B11	M2661	x	M2131	x	M4191	= 7,7%
	M2661		x		M4191	= 7,3%
B12	M4051	x	M2131	x	M4228	= 3,5%
	M4051		x		M4228	= 3,6%
B13	M4051	x	M2131	x	M4191	= 6,2%
	M4051		x		M4191	= 5,3%

Die Marker M6702 (C7) und M2631 (C8) bzw. M2131 (C18) und M4228 (C19) erscheinen nach der Genetik sehr eng gekoppelt (Abb.12), was im zweiten Fall deswegen besonders bemerkenswert ist, weil zwischen diesen beiden Mutationsorten der Bereich lokalisiert ist, innerhalb dem ein Großteil sowohl der rho$^-$ als auch der mit$^-$ Deletionen entspringen (vgl. Abb.9 und Abb.10). Dies darf als Hinweis interpretiert werden, daß die Entstehungsorte der meisten Deletionen in einem auch physisch relativ engen Abschnitt der mtDNS liegen dürften.

Als Kontrolle wurden Kreuzungen mit dem Stamm M7984 durchgeführt, die in keinem Falle zum Auftreten von Rekombinanten führten. Dies entspricht der Erwartung, da es sich beim M7984 um eine mit$^-$ Deletionsmutante handelt, die alle Cluster von C3 bis C25 verloren hat.

Abb.12 : Ergebnisse der quantitativen Rekombinationsanalyse



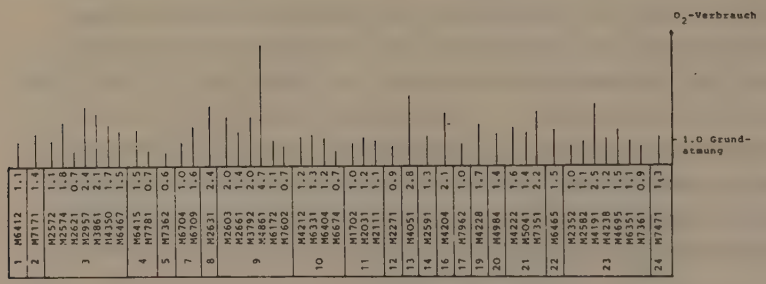
Anhand der bereits etablierten genetischen Karte (vgl. Abb.11) wurden fünf, über die OXI3-Region verteilte Mutanten-Positionen, M2571 (C3), M2661 (C9), M4051 (C13), M2131 (C18) und M4191 (C23), ausgewählt und gegen eine Reihe Repräsentanten anderer Cluster gekreuzt. In der Darstellung sind die jeweiligen Kreuzungspartner durch Anfangs- und Endpunkt von horizontalen Linien ersichtlich, die neben diesen Linien angeführten Zahlenwerte benennen die aus mehreren Kreuzungen ermittelten prozentualen Wildtyprekombinanten-Bildungsraten (Verhältnis von Wildtyp-Rekombinanten zu insgesamt gewachsenen Zellen). Weitere Einzelheiten siehe Text.

1.7.) Komplementation

Während in Rekombinationsanalysen das Zustandekommen von Wild-Genotypen, also die Neuanordnung der Allele auf DNS-Ebene, geprüft wird, untersuchen Komplementationstests, ob eine wechselseitige Supplementierung zweier Mutanten auf der Ebene der Translationsprodukte möglich ist. Zur Unterscheidung beider Varianten der Herstellung eines Wild-Phänotyps - im vorliegenden Fall: (Teil-) Rekonstitution der Atmungsfähigkeit - werden die methodischen Bedingungen für die Komplementations-Untersuchungen so gewählt, daß zum Zeitpunkt ihrer Durchführung noch keine Rekombinanten gebildet worden sein können.

So wurde eine Serie von 54 über die OXI3-Region verteilten mit Mutanten - die technische Seite ist auf S.20 ausgeführt - zur Erzielung von Zygoten mit je einem Referenzstamm gekreuzt. Der gemessene Sauerstoffverbrauch des letzteren, nach Kreuzung mit sich selbst, wurde als Grundatmung definiert und gleich 1.0 gesetzt. Die in Abb. 13 gezeigte Figur, mit dem Stamm M2352 (C23) als Referenz, ist insoweit exemplarisch, als die gefundenen Werte in diesem wie in allen anderen untersuchten Fällen, nach Korrektur gegen den Zelltiter , nur wenig um die Grundatmung variieren, doch keinesfalls an den Wildtyp-Standard (das 12 bis 15-fache der Grundatmung) heranreichen. Die OXI3-Region scheint demnach eine einzige Komplementationsgruppe zu repräsentieren, ein Tatbestand, auf den auch von anderer Seite bereits hingewiesen worden war (105).

Abb.13 : Repräsentatives Beispiel eines Komplementationstests



Die vorliegende Abbildung gibt ein Beispiel für das Ergebnis mehrerer durchgeführter Tests zur Prüfung des Komplementationsverhaltens von mit Punktmutanten der OXI3-Region. Die Kreuzung des Referenzstammes M2352 (C23) gegen die anderen Mutanten ergab in keinem Fall O_2-Verbrauchswerte, die in etwa an Wildtypstandard heranreichen. Die einzig diskutierbare Ausnahme könnte die Mutante M4861 (C9) sein, da eine immerhin fünf-fache Erhöhung der Grundatmung als signifikante Wiederherstellung der Atmungsfähigkeit interpretiert werden kann. Zur Methode vgl. S. 20f.

2.) Untersuchungen des Phänotyps

2.1.) Temperatursensitivität und "leakiness"

Wie bereits erwähnt, wirken sich die mutativen Veränderungen in mit⁻Mutanten phänotypisch als Unfähigkeit, auf nicht-vergärbarem Substrat zu wachsen, aus. Dieser Effekt dürfte im allgemeinen darauf zurückzuführen sein, daß ein für die Energiegewinnung über den Weg der Atmung funktionelles Polypeptid von der Mutation betroffen ist. In Abhängigkeit nun von der jeweils durch die Mutation affizierten Aminosäure-Position im Protein, können dessen Struktur und sonstige Eigenschaften in unterschiedlicher Weise verändert sein. Ein relativ häufig auftretendes Resultat eines solchen Mutationsschritts ist die temperatur-abhängige Inaktivierung von (Protein)Funktionen: Die verschiedenen Typen von Temperaturempfindlichkeit unterscheiden sich durch die jeweilige(n) nicht-permissive(n) Wachstumstemperatur(en).

Im vorliegenden Fall - alle mit⁻Mutanten wurden nach dem S.21 geschilderten Verfahren getestet - konnten 15% der Stämme in drei Kategorien von Temperaturabhängigkeit eingeteilt werden; die Ergebnisse sind im Einzelnen auf S.54 in Tab.2 aufgeschlüsselt.

Die Verteilung dieser konditionellen Mutanten über die OXI3-Region ist insofern von besonderem Interesse, als unter der Voraussetzung, daß eine Gen-Organisation vom Mosaiktyp vorliegt, die temperatursensitiven Mutanten geclustert auftreten sollten. So erwies sich in der Analyse der COB-Region, daß diese konditionellen Mutanten bevorzugt, wenn nicht ausschließlich in Intron-Bereichen des Cytochrom-b-Genes aufgefunden werden. Tatsächlich treten auch in der OXI3-Region die Mutanten mit temperatur-abhängiger Wachstumshemmung in Clustern auf, wie die folgende Zusammenstellung zeigt:

Es gibt fünf, als T1 bis T5 bezeichnete Bereiche, in denen hitze-sensible (hs), kälte-sensible (cs) oder solche konditionelle Mutanten akkumuliert sind, die weder bei 20°C, noch bei 35°C wachsen (hs/cs):

T1: In den genetischen Clustern C2 und C3 liegen zwei cs-, eine hs- und vier hs/cs-Mutanten, das Verhältnis von konditionellen zur Gesamtzahl von $\underline{mit}^{-}_{oxi3}$Mutanten in diesem Bereich entspricht 7:26, das sind ca. 25%.

T2: Cluster C8 mit drei Mutanten beherbergt eine hs-Mutante.

T3: Clusterbereich C10/11 hat acht hs/cs-Mutanten, das Verhältnis zur Gesamtzahl beträgt 8:25 (ca.30%).

T4: Cluster C14 trägt eine hs- und vier cs-Mutanten, d. h. ein Verhältnis von 5:7 (ca.70%).

T5: Clusterbereich C20-C23 mit neun hs- und zwei hs/cs-Mutanten entspricht einem Verhältnis von 11:24, d.h. ca. 45%.

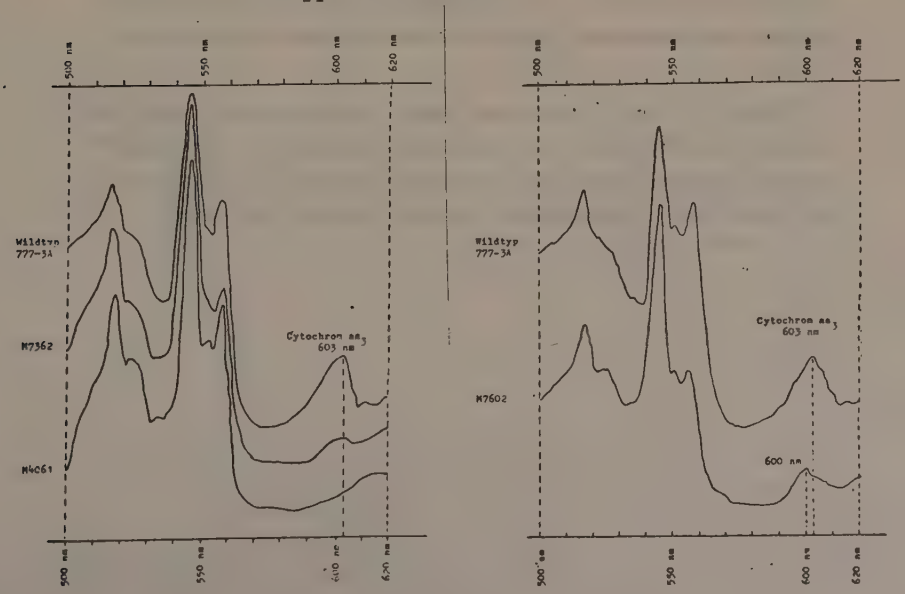
Insgesamt elf der untersuchten $\underline{mit}^{-}_{oxi3}$Mutanten zeigen bei allen Temperaturen, also auch bei der permissiven von 30°C, ein stark verzögertes Wachstum. Erst nach 10 bis 15 Tagen werden annähernd "normale" Koloniegrößen sichtbar. Dieser Mutantentyp wird als "leaky" bezeichnet und es wird angenommen, daß das von der Mutation betroffene Genprodukt zwar im Prinzip seine Funktion noch verrichten kann, dies jedoch mit verringerter Effizienz. In sieben Fällen ist die "leakiness" verbunden mit Hitzesensitivität, d.h. die Mutanten wachsen nicht bei 35°C und nur stark retardiert bei 20°C und 30°C (vgl.Tab.2).

2.2.) Tieftemperatur-Cytochromspektren

Die Cytochrome b, c, c_1 und aa_3 der Atmungskette absorbieren spektrales Licht im Wellenlängenbereich zwischen 620 und 400 nm. Bei der Examinierung von mitochondrialen Mutanten mit Defekten im Cytochrom b (Absorptions-peak bei 558,5 nm) bzw. im Cytochrom aa_3 (bei 602 nm) ist im allgemeinen mit Auswirkungen auf die zugehörigen spektralen Banden zu rechnen. So haben die meisten der untersuchten mit^-_{oxi3}Stämme die Cytochrom aa_3-Bande verloren oder stark reduziert vorliegen (vgl. Tab.2).

Bei 22 Mutanten (ca.12%), die zwar atmungsdefekt sind und innerhalb der OXI3-Region kartieren, wird eine Cytochrom aa_3-Bande mit deutlicher Absorption gefunden (vgl. Tab.2); in einigen Fällen ist dabei der Absorptions-peak bis nach 589 nm hin verschoben (siehe Abb.14). In der COB-Region wurde eine vergleichbare Rate solcher Mutantenphänotypen gefunden, wobei es sich ausschließlich um Exonmutanten handelt (56).

Abb.14 : Tieftemperatur-Cytochromspektren von Wildtyp und Mutanten



In einem Fall, bei der Untersuchung der Mutante M4695 (C23), zeigte die spektrale Analyse weder die aa_3-, noch die b-Bande. In der COB-Region wurden solche Doppelmutanten in größerer Zahl gefunden, wo sie in erster Linie in Intron-Bereichen liegen (56). Dieses Phänomen hat zu Spekulationen über eine Interaktion zwischen Introns beider Gene - insbesondere den Introns bI4 und aI4, die auch Sequenzhomologien aufweisen (52,59,69) - Anlaß gegeben, wiewohl bislang keine befriedigenden Erklärungen gefunden werden konnten (105).

2.3.) Atmungsmessung an ganzen Zellen

Um zu prüfen, ob es Korrelationen zwischen der den $mit^-_{oxi\,3}$ Mutanten verbliebenen restlichen Atmungsfähigkeit und anderen Parametern, wie z.B. der Temperaturabhängigkeit des Wachstums, gibt, wurde an einer repräsentativen Serie von Mutanten, nach Einkreuzung des Wildtypallels OP1 mit Hilfe eines rho^0 Stammes, der Sauerstoffverbrauch bestimmt. Die Ergebnisse der Messung sind in Abb.15 zusammengefaßt. Ein Vergleich mit der Zusammenstellung phänotypischer Daten in Tab.2 offenbart keine auffälligen Zusammenhänge zwischen den teilweise stark fluktuierenden Werten der Restatmung und anderen Charakteristika der Mutanten.

Einige in den Ergebnissen der Atmungsmessung gefundene Unterschiede weisen aber immerhin darauf hin, daß die meisten der in einzelnen Clustern zusammengefaßten Mutanten nicht auf identischen Allelen beruhen dürften.

Abb.15 : Ergebnisse der Atmungsmessung an ganzen Zellen

a) Genetisch bestimmte Cluster von mit Punktmutanten der OXI3-Region: 1 - 25.

b) Diesen Clustern zugeordnete Mutanten, an denen die Restatmung ganzen Zellen polarographisch bestimmt wurde.

c) Die bestimmte Atmungsaktivität in µmol O_2/min/10^7Zellen.

d) Graphische Veranschaulichung der Aktivitätsunterschiede.

Tabelle 2 : Phänotypen der mit $^{-}_{oxi3}$ Mutanten

Mutante	Reversion	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Spektrale Banden der Cytochrome aa_3	b	Cluster
M6412	-	-	-	-	+	(1)
M7171	+	cs)	-	-	+	(2)
M2571	-	-	-	-	+	(3)
M2572	-	-	-	-	+	"
M2574	+	-	-	-	+	"
M2621	-	hs	-	-	+	"
M2951	+	hs/cs	-	-	+	"
M2953	+	-	-	-	+	"
M2955	-	-	-	-	+	"
M2957	-	-	-	-	+	"
M2958	+	hs/cs	-	-	+	"
M3861	+	-	-	-	+	"
M4121	+	-	-	-	+	"
M4350	-	-	-	-	+	"
M6467	-	-	-	-	+	"
M6582	-	-	-	-	+	"
M6632	+	-	+	-	+	"
M6796	+	cs)	-	-	+	"
MB30	-	-	-	-	+	"
MB52	-	-	-	-	+	"
MB54	+	-	-	-	+	"
MB83	-	-	-	-	+	"
MD62	+	hs/cs	-	-	+	"
ME9	+	-	-	-	+	"
MF31	-	-	-	-	+	"
MF74	-	-	-	-	+	"
MG81	+	hs/cs	-	-	+	"
M6415	-	-	-	-	+	(4)
M7342	-	-	-	-	+	"
M7781	-	-	-	-	+	"
M7783	-	-	-	-	+	"
MA33	-	-	-	-	+	"
MB32	-	-	-	-	+	"
ME23	-	-	-	-	+	"
ME73	-	-	-	-	+	"
ME84	-	-	-	-	+	"
ME86	-	-	-	-	+	"
U1-D5	-	-	-	-	+	"
M7362	+	-	-	-	+	(5)
MB61	-	-	-	-	+	"
MF15	-	-	-	-	+	"
M7811	+	-	-	(+)	+	(6)
ME78	-	-	-	(+)	+	"

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Mutante	Reversion	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Spektrale Banden der Cytochrome		Cluster
				aa_3	b	
M6701	+	-	-	-	+	(7)
M6702	+	-	-	-	+	"
M6704	-	-	-	-	+	"
M6709	+	-	-	-	+	"
M7601	+	-	-	(+)	+	"
MD27	-	-	-	-	+	"
MD69	-	-	-	-	+	"
MH8	+	-	-	-	+	"
MH9	+	-	-	-	+	"
MH10	-	-	-	-	+	"
MH19	+	-	-	-	+	"
MH20	+	-	-	-	+	"
M2631	-	-	-	(+)	+	(8)
M5010	-	hs	+	-	+	"
MA40	-	-	-	-	+	"
M2462	+	-	-	(+)	+	(9)
M2603	-	-	-	(+)	+	"
M2661	-	-	-	-	+	"
M3792	+	-	-	-	+	"
M4711	+	-	-	-	+	"
M4861	-	-	-	(⊕)	+	"
M4862	+	-	-	(⊕)	+	"
M4993	-	-	-	(⊕)	+	"
M6172	-	-	-	-	+	"
M6431	-	-	-	-	+	"
M7602	-	-	+	(⊕)	+	"
MB73	+	-	-	-	+	"
MB92	+	-	-	(⊕)	+	"
ME22	-	-	-	-	+	"
ME44	-	-	-	-	+	"
ME89	-	-	-	-	+	"
MF10	-	-	-	-	+	"
MF23	-	-	+	-	+	"
MF54	+	-	-	-	+	"
MG23	-	-	-	(⊕)	+	"
MG93	-	-	-	-	+	"
MG94	+	-	-	-	+	"
M4212	-	-	-	-	+	(10)
M4213	-	-	-	-	+	"
M6283	+	-	-	-	+	"
M6331	-	-	-	-	+	"
M6404	-	-	-	(+)	+	"
M6464	+	-	-	-	+	"

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Mutante	Reversion	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Spektrale Banden der Cytochrome aa_3	b	Cluster
M6561	+	hs/cs[a]	-	-	+	(10)
M6562	-	hs/cs[a]	-	-	+	"
M6674	+	-	-	-	+	"
M6684	-	-	-	-	+	"
M7952	+	-	-	-	+	"
MB90	-	-	-	-	+	"
MF12	+	-	-	-	+	"
MF63	+	-	-	-	+	"
MG67	-	-	-	-	+	"
U2-A2	-	-	-	-	+	"
M1702	-	hs/cs	-	-	+	(11)
M2031	-	hs/cs	-	-	+	"
M2111	-	-	-	-	+	"
M4209	+	-	-	-	+	"
MA5	-	hs/cs	-	-	+	"
MA6	-	hs/cs	-	-	+	"
MA 35	-	hs/cs	-	-	+	"
MF67	-	hs/cs	-	-	+	"
MG73	-	-	-	-	+	"
M2271	-	-	-	-	+	(12)
M2981	-	-	-	-	+	"
M4051	-	-	-	-	+	(13)
MA13	-	-	-	-	+	"
MA23	-	-	-	(+)	+	"
MA34	+	-	-	-	+	"
MA36	-	-	-	-	+	"
MA39	-	-	-	-	+	"
MA68	-	-	-	-	+	"
MA70	-	-	-	-	+	"
MB9	+	-	-	(+)	+	"
MB12	-	-	-	-	+	"
MB64	-	-	-	-	+	"
MB86	-	-	-	-	+	"
MD60	+	-	-	-	+	"
MD63	+	-	-	-	+	"
MD66	-	-	-	-	+	"
MD70	-	-	-	-	+	"
MD74	-	-	-	-	+	"
MD90	-	-	-	(+)	+	"
ME6	-	-	-	-	+	"
ME67	+	-	-	-	+	"
MF72	-	-	-	-	+	"
MF73	-	-	-	-	+	"

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Mutante	Reversion	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Spektrale Banden der Cytochrome aa_3	b	Cluster
MG63	-	-	-	-	+	(13)
MG75	+	-	-	-	+	"
MG78	-	-	-	-	+	"
U1-B1	-	-	-	-	+	"
U1-D3	+	-	-	(+)	+	"
U1-D4	-	-	-	-	+	"
M2591	+	hs/cs hs^a	-	-	+	(14)
MB60	-	-	-	-	+	"
MB71	-	hs^a	-	-	+	"
MB88	-	hs/cs	-	-	+	"
ME8	-	-	-	-	+	"
MG38	-	hs/cs hs^a	-	-	+	"
U1-D6	-	hs/cs	-	-	+	"
M4061	-	-	-	-	+	(15)
MB28	-	-	-	-	+	"
MB94	-	-	-	-	+	"
M4204	+	-	-	-	+	(16)
MD95	+	-	-	-	+	"
M7962	-	-	-	-	+	(17)
MA88	-	-	-	(+)	+	"
MB63	+	-	-	-	+	"
MF92	-	-	-	-	+	"
M2131	-	-	-	-	+	(18)
M4228	-	-	-	-	+	(19)
M4984	-	hs	+	-	+	(20)
M7181	-	-	-	-	+	"
M4210	-	-	-	-	+	(21)
M4222	-	-	-	-	+	"
M5041	-	hs	-	-	+	"
M6708	-	hs	+	-	+	"
M7351	+	hs	+	-	+	"
M6364	-	-	-	-	+	(22)
M6465	-	hs	+	-	+	"
MF83	-	-	+	-	+	"
M2352	-	-	-	-	+	(23)
M2582	-	-	+	-	+	"

Tabelle 2 (Fortsetzung):

Mutante	Reversion	Temperatur-sensitivität	"leakiness"	Spektrale Banden der Cytochrome aa_3	b	Cluster
M4051	-	hs[a]	-	-	+	(23)
M4191	-	-	-	-	+	"
M4220	-	hs/cs[a]	-	-	+	"
M4238	-	hs	-	-	+	"
		hs/cs[a]				
M4695	-	-	-	-	-	"
M4961	+	hs	+	⊕	+	"
M6351	-	hs	+	(+)	+	"
M6581	+	hs/cs	-	-	+	"
M6811	-	-	-	-	+	"
M7361	+	-	-	(⊕)	+	"
M7742	-	-	-	-	+	"
M7791	+	-	+	-	+	"
M7471	-	-	-	-	+	(24)
M7473	-	-	-	-	+	"
M7474	-	-	-	-	+	"
M4351	-	-	-	-	+	(25)

Zeichenerklärung zu Tab.2:

Reversion: + = Mutanten revertieren zum Wildtyp-Phänotyp Atmungsfähigkeit.
- = Keine Reversionsneigung beobachtet.

Temperatursensitivität:

hs= hitzesensibel
cs= kältesensibel
a = Sensitivität erscheint nur, wenn dem Nährboden Äthanol zugesetzt ist
- = Keine Temperaturabhängigkeit des Wachstums feststellbar.

"leakiness":

+ = verzögertes Wachstum bei allen Temperatuten

Spektren: - = keine spektrale Bande gefunden
(+)= Spektrum annähernd dem des Wildtyp-Cytochroms
+ = Spektrum wie Wildtyp
⊕ = Wildtyp-Spektrum mit Verschiebung des Absorptionspeaks.

Tabelle 3 : Liste der rho⁻ Mutanten

rho⁻ Klasse	Stammbezeichnung	unabhängige Induktionsansätze	Zurückbehaltene mit⁻ Gruppen[1]	Cluster[2]
I	BM1-su2	ic	1' - 20'	C1 - C25
	HK3 HK7 HK10 HK12 HK14	id		
	HK246 HK248 HK249 HK250	ig		
II	HK226	ig	5' - 20'	C10 - C25
II-a	HA1	ia	5' - COB	C10 - COB
III	HK226-3	ig	6' - 20'	C11 - C25
IV	HK231-c	ig	6' - 19'	C11 - C24
V	HK219	ig	11' - 20'	C16 - C25
VI	HB2 HE4	ia	12' - 20'	C17 - C25
VII	HA2 HA3 HE5	ia	13' - 20'	C18 - C25
	HK121	ie		
VIII	HE5	ia	13' - 19'	C18 - C24
IX	HF1	ia	14' - 20'	C19 - C25
	HK1 HK6 HK43 HK51 HK55 HK57	id		
	HK89 HK101 HK102 HK105 HK106	ie		

1) bezieht sich auf Abb.10, S.38

2) auf Abb.11, S.41

Tabelle 3 : Liste der rho⁻ Mutanten (Fortsetzung)

rho⁻ Klasse	Stammbezeichnung	unabhängige Induktionsansätze	Zurückbehaltene mit⁻ Gruppen[1] Cluster[2]
IX	HK107	ie	14' - 20' C19 - C25
	HK108		
	HK111		
	HK112		
	HK114		
	HK115		
	HK117		
	HK118		
	HK119		
	HK120		
	HK122		
	HK124		
	HK126		
	HK127		
	HK131		
	HK134		
	HK135		
	HK136		
	HK137		
	HK139		
	HK142		
	HK185	if	
	HK187		
	HK188		
	HK190		
	HK191		
	HK192		
	HK193		
	HK194		
	HK195		
	HK196		
	HK197		
	HK208	ig	
	HK209		
	HK210		
	HK211		
	HK212		
	HK213		
	HK216		
	HK218		
	HK220		
	HK223		
	HK231		
	HK232		
	HK234		
	HK235		
	HK236		
	HK237		
	HK244		

Tabelle 3 : Liste der rho⁻ Mutanten (Fortsetzung)

rho⁻ Klasse	Stammbezeichnung	unabhängige Induktionsansätze	Zurückbehaltene mit⁻ Gruppe[1]	Cluster[2]
X	K31-M	ih	14' - 19'	C19 - C24
	HK1-3 HK57-1	id		
	HK140 HK141 HK143	ie		
	HK186 HK189 HK198 HK205 HK206 HK207	if		
	HK217 HK227 HK228 HK230 HK233	ig		
XI	HK99	ie	15' - 20'	C20 - C25
XII	HB1	ia	16' - COB	C21 - COB
XIII	HC1	ib	17' - COB	C22 - COB
XIV	HK98 HK100 HK103 HK104 HK109 HK110 HK113 HK116 HK123 HK125 HK129	ie	18' - 20'	C23 - C25
	HK180	if		
XV	HC1-1 HC2	ib	18' - 19'	C23 - C24
	HK8 HK9 HK13 HK61 HK73	id		

Tabelle 3 : Liste der rho⁻Mutanten (Fortsetzung)

rho⁻Klasse	Stammbezeichnung	unabhängige Induktionsansätze	Zurückbehaltene mit⁻ Gruppe[1]	Cluster[2]
XVI	HF4	ia	19'	C24
XVII	HD1	ia	1' - 13'	C1 - C18
	HC59-R	ib		
	HF2-I HG-I	ia		
XVIII	HD1-1	ia	2' - 13'	C6 - C18
XIX	HE2-1	ia	3' - 13'	C8 - C18
XX	HK150	ie	3' - 10'	C8 - C15
XXI	HK165	if	3' - 9'	C8 - C14
XXII	HK156	ie	3' - 8'	C8 - C13
XXIII	HK145 HK148 HK149 HK151	ie	3' - 7'	C8 - C12
	HK167 HK168 HK169 HK170 HK171 HK174 HK176	if		
XXIV	HK173	if	3' - 6'	C8 - C11
XXV	HK165-S3	if	4' - 9'	C9 - C14
XXVI	HK156-R1	ie	4' - 8'	C9 - C13
XXVII	HK150-S2	ie	4' - 7'	C9 - C12

3.) Restriktionsanalyse von mit⁻ Deletionsmutanten

Die Ergebnisse der genetischen Feinstrukturanalyse hatten die Einteilung des verfügbaren Materials an atmungsdefekten mit⁻ Stämmen in 25 Untergruppen von Punkt- und 9 Klassen Deletionsmutanten erlaubt. An der damit etablierten Karte der OXI3-Region blieb, der Beschränktheit des methodischen Wirkungsgrades genetischer Kartierung gemäß, ein bestimmter Aspekt unbefriedigend bestehen: Der geringe Auflösungsgrad einiger "hot spots" (vgl.Abb.11-b, S.41) und im Zusammenhang damit die Frage nach den reellen Größen der genetischen Cluster, respektive der Region insgesamt.

Um nun den Zusammenhang herzustellen zwischen den einander genetisch zugeordneten Markern und deren physischen Positionen, war es naheliegend, eine Restriktionsanalyse durchzuführen. Eine Zerlegung der gesamten mtDNS mit einer Länge von ca. 75 kb führt zu einer großen Zahl von Fragmenten unterschiedlicher Größe und eine Zuordnung dieser Teilsequenzen zu bestimmten Genregionen ist eine außerordentlich aufwendige Arbeit (vgl. dazu (42)). Ein erfolgversprechender Weg unmittelbar an den mtDNS-Bereich der OXI3-Region selektiv heranzukommen, bietet sich prinzipiell durch zwei Typen von Deletionsmutanten:

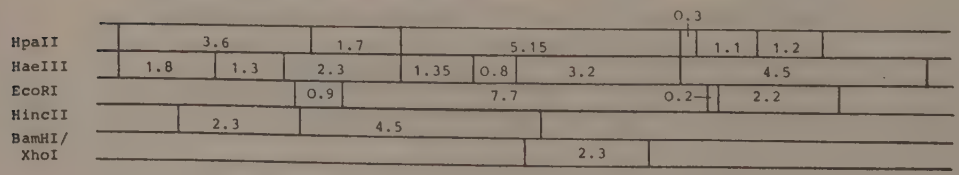
a) rho⁻ Mutanten, die unterschiedliche Sequenzen der OXI3-Region zurückbehalten haben; die von ihrem Restgenom genetisch rekonstituierbaren Mutanten-Marker (mit⁻), lassen sich korrelieren mit der physischen Länge der gefundenen Restriktionsfragmente.

b) mit⁻ Δ-Mutanten, denen im Vergleich zum Wildtyp

entsprechend der Größe ihrer Deletion (Teil-) Fragmente der mtDNS fehlen. Deren Unterschiede können in Beziehung zur Rekonstitutionsfähigkeit der jeweiligen Deletionsmutante gesetzt werden, was ebenfalls Aussagen über Zusammenhänge von der genetischen und physischen Verfassung der OXI3-Region erlaubt.

Im Folgenden soll an einigen Beispielen von mit$^-$ Deletionsmutanten gezeigt werden, daß die auf genetischem Weg ermittelten Deletionen (S.29f und Tab.4) sich auch in einer physischen Analyse anhand des Fehlens entsprechender mtDNS-Fragmente verifizieren lassen. Dabei ist eine Bezugnahme auf frühere Untersuchungen (42), da diese an anderen Stämmen von Saccharomyces cerevisiae durchgeführt worden waren, nur unter dem Vorbehalt möglich, daß infolge diverser Insertionen (vgl.(106)) Unterschiede im Restriktionsmuster existieren (107). Lediglich die Arbeiten von SCHINDLER (108), am Stamm 777-3A durchgeführt, können diesbezüglich umstandslos als Rahmen für die Interpretation der eigenen Ergebnisse mitherangezogen werden und sollen hier kurz eingeführt werden:

- Aus Restriktionen von mtDNS des genannten Wildtyps mit den Endonucleasen HaeIII, HpaII, EcoRI, HincII und Doppelverdauung mit BamHI/XhoI wurden folgende Wildtyp-Originalfragmente für die OXI3-Region gefunden:



- Die Bestimmung dieser Fragmente als der OXI3-Region zugehörig erfolgte über SOUTHERN-Hybridisierung (109) gegen ^{32}P-markierte mtDNS-Stücke aus rho$^-_{oxi3}$ Mutanten.

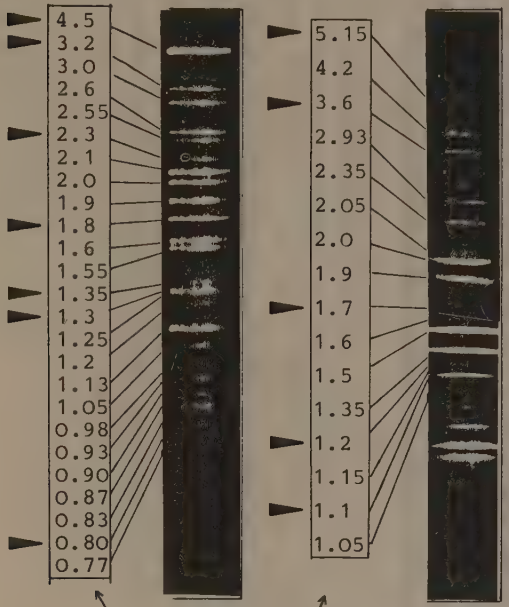
- Auf Grundlage der Kenntnis der Originalfragmentgrössen ist es möglich, die mit⁻ Deletionsmutanten daraufhin zu untersuchen, welche dieser Fragmente jeweils fehlen; die neun genetisch bestimmten Mutantenklassen ließen sich in der physischen Analyse zu fünf Gruppen (ΔA - ΔE) zusammenfassen (vgl. Tab.4).
- Für die Mutante M7984 (ΔIII), welche der genetischen Kartierung zufolge die Cluster C3 bis C25 deletiert, also beinahe die gesamte OXI3-Region verloren hat, hat nach den Ergebnissen der Restriktionsanalyse eine Deletion von ca. 11,8 kb.

In eigenen Untersuchungen konnte an einer Reihe von mit⁻ Deletionsmutanten - isoliert aus der Serie MA - MH - die Existenz weiterer Deletionen unterschiedlichen Umfangs dokumentiert werden. Wie in Abb.16 dargestellt, diente der Wildtyp 777-3A jeweils als Referenz für die Originalfragmente.

Nach Verdauung mit HaeIII (Bspl. Abb.16-b) fehlen im Restriktionsmuster der untersuchten Stämme vom mit⁻ Deletionsmutantentyp ΔI, ΔII und ΔIV die OXI3-Wildtypfragmente 1,8 kb; 1,3 kb; 2,3 kb; 1,35 kb; 0,8 kb und 3,2 kb . Daraus läßt sich für die Deletionen dieser Mutanten eine Größenordnung von etwa 10,7 kb ableiten.
Die Mutanten vom Typ ΔVI und ΔVII haben die Wildtyp-Fragmente 2,3; 1,35; 0,8 und 3,2 kb verloren. Die daraus errechenbare Deletionsgröße liegt bei 7,6 kb.

Die Ergebnisse der HpaII-Restriktionsverdauuung (Abb. 16-c): Die untersuchten Mutanten vom genetisch bestimmten Typ ΔI, ΔII und ΔIV haben im Restriktionsmuster die Originalfragmente 3,6 kb; 1,7 kb und 5,15 kb verloren. Die Mutanten vom Typ ΔVI und ΔVII zeigen die Fragmente 1,7 kb und 5,15 kb nicht; letzteres erscheint verkürzt bei ca. 2,9 kb. Das ergibt für den ersten Fall eine Deletionsgröße von 10,4 kb, für den zweiten von 7,6 kb.

Restriktionsmuster des Wildtyp-stamms 777-3A



Fragmentgrößen angegeben in kb.
Originalfragmente der OXI3-Region: ►
(durch Southern-Hybridisierung gefunden (108)).

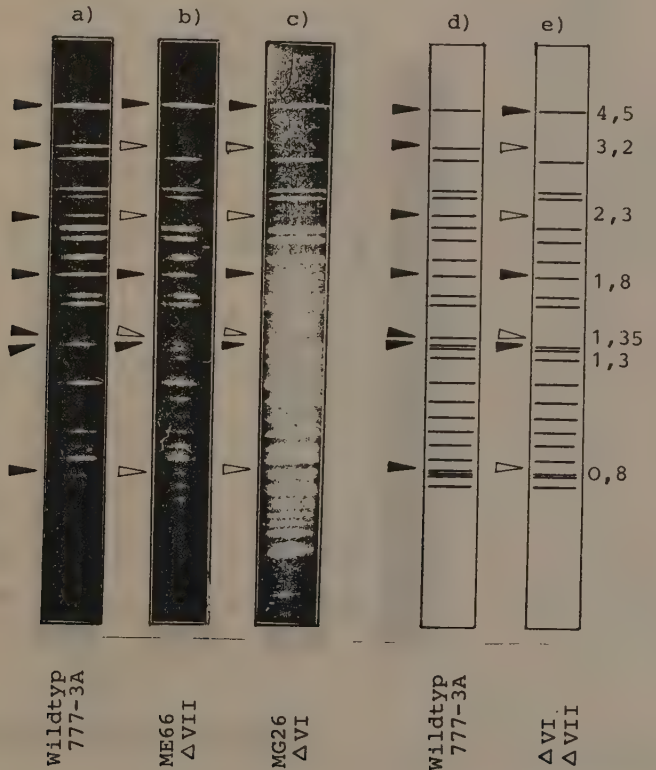
Vergleichende Liste von DNS-Fragmenten der OXI3-Region bei Wildtyp und mit⁻ Deletionsmutanten:

	Wildtyp	mit⁻ Δ-Mutanten	
		ΔI, II, IV	ΔVI, VII
HaeIII	4.5 kb	4.5 kb	4.5 kb
	3.2	-	-
	2.3	-	-
	1.8	-	1.8
	1.35	-	-
	1.3	-	1.3
	0.8	-	-
HpaII	5.15 kb	-	-
	3.6	-	- (2.95)
	1.7	-	-
	1.2	1.2	1.2
	1.1	1.1	1.1

- : deletiertes Fragment
( ): verkürztes Fragment

Abb. 16-b

HaeIII-Restriktionsverdauung



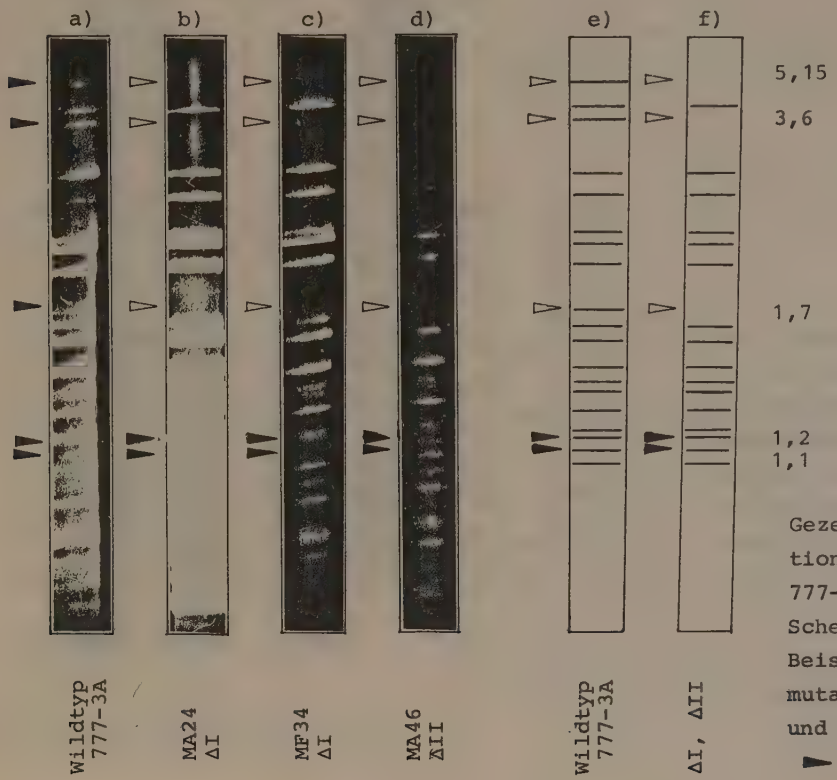
Gezeigt sind HaeIII-Restriktionsmuster des Wildtypstamms 777-3A (a: im Photo; d: im Schema) im Vergleich zu zwei Beispielen von mit⁻ Deletionsmutanten des Typs ΔVII (b; e) und ΔVI (c; e).

▬ : Wildtyp-Originalfragmente

▷ : Deletierte Fragmente

Abb.16-c

HpaII-Restriktionsverdauung



Gezeigt sind HpaII-Restriktionsmuster des Wildtypstamms 777-3A (a : im Photo, e: im Schema) im Vergleich zu drei Beispielen von mit Deletionsmutanten des Typs ΔI (b, c; f) und des Typs ΔII (d,f).

▬◀ : Wildtyp-Originalfragmente

▷ : Deletierte Fragmente

Tabelle 4 : Gruppierung der mit Deletionsmutanten nach physischen Kriterien

Typ		deletierte Cluster	Stammbezeichnung	
Physisch	Genetisch		M	MA - MH
ΔA	ΔI	2 - 18	M3001 M3771 M6463 M7402	MA24 MB93 MF29 MF30 MF34 MF37 MF38 MH1
	ΔII	2 - 17	M4363	MA46
	ΔIV	3 - 18	M2561 M2564 M2612 M2993 M6031	
ΔB	ΔVII	5 - 18	M2613 M6363 M6382 M6411 M7381	MA28 MD79 MD80 ME65 ME66
	ΔVIII	6 - 18	M4021 M4354 M6381 M7172 M7461 M7741	
	ΔIX	7 - 18	M2932 M3781	
ΔC	ΔV	4 - 25	M4911	
ΔD	ΔIII	3 - 25	M7984	
ΔE	ΔVI	5 - 25	M4917	MG26

D) DISKUSSION

Bei den ersten genetischen Analysen des mitochondrialen Genoms von Saccharomyces cerevisiae traten unter den induzierten atmungsdefekten Mutantendiejenigen deutlich als Majorität hervor, die einen Defekt in der Funktion der Cytochrom c Oxidase aufweisen (43, 63). Die Autoren konnten zeigen, daß diese mit⁻ Mutanten in drei separaten Abschnitten des mitochondrialen Genoms lokalisiert sind und unter diesen wiederum die als OXI3 bezeichnete, die Untereinheit I des Polypeptids codierende Region durch ihre Größe wie durch die Anzahl der in ihr lokalisierten atmungsdefizienten Mutanten hervorsticht (vgl. Abb.1). Die OXI3-Region weist nach neuesten Untersuchungen (106, 107) in Form verschiedener Insertionen stammspezifische Unterschiede im Umfang ihrer DNS-Sequenz auf: Dieser beträgt für den Wildtyp-Stamm D273-10B ca. 10 kb (37), für den auch in dieser Arbeit verwendeten Stamm 777-3A ca. 12.8 kb (107). Damit umfaßt sie etwa 1/6 der Gesamtlänge der mtDNS.

Das dieser Region zugeordnete Genprodukt hat, nach früheren, auf gel-elektrophoretischen Messungen beruhenden Schätzungen ein Molekulargewicht von 40 kd (39), nach neuen, genaueren Daten aus Sequenzierungsanalysen von 56 kd (37); für ein Protein dieser Größe ist eine codierende Sequenz von ca. 1.5 kb ausreichend. Wie durch Bestimmung der OXI3-Sequenz (37) bereits erwiesen, ist die Region als Mosaik-Gen organisiert, in dem die für die Expression des ihr zugeordneten Genprodukts nötigen Exon-Bereiche etwa 1/8 der Sequenz ausmachen.

Erstes Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bereitstellung und genetische Charakterisierung einer großen Zahl von Mutanten dieser Genregion.

1.) Genetik

Die Erstellung einer genetischen Karte wurde mit Methoden angegangen, die sich bereits in anderen, an der Bäckerhefe durchgeführten Untersuchungen bewährt hatten: Der rho⁻ Retentionskartierung (43, 63), der qualitativen und quantitativen Rekombinationsanalyse (38).

Die mit Hilfe von rho⁻ Deletionsmutanten durchgeführte Kartierung (zum Prinzip vgl. S.7), erlaubte eine Unterteilung der mit⁻$_{oxi3}$ Mutanten in Gruppen und eine Festlegung von deren Lage untereinander. Auffällig war dabei eine starke Ungleichmäßigkeit in der zahlenmäßigen Verteilung der Mutationsorte auf verschiedene Gruppen. Auch nach Induktion einer größeren Anzahl von rho⁻ Mutanten und deren gezielter Subklonierung war zwar eine Feinkarte der Region erstellt worden, - insgesamt 20 Gruppen konnten unterschieden werden (vgl. Abb.10) - doch blieb die Variation in der Markerverteilung im Prinzip erhalten: Sie reicht von einem bis zu achtundzwanzig Markern pro Gruppe (vgl. Abb. 11-b). Dieses Resultat spricht gegen eine zufallsbedingte Verteilung.

Diese Inhomogenität im Auftreten der Mutationen dürfte, wie bei den klassischen "hot spots" exemplarisch gezeigt, darauf zurückzuführen sein, daß die betreffenden Bereiche der DNS eine besondere Bedeutung für Struktur und/oder Funktion des zugehörigen Genprodukts haben, was im Falle von mutativen Veränderungen dazu führt, daß diese in deutlich gehäuftem Maße phänotypisch sichtbar werden. Ergänzend muß in diesem Zusammenhang festgestellt werden, daß die Verteilung von Mutationen nicht nur von der Basenzusammensetzung der betroffenen DNS, sondern auch von der Art der Mutagenese abhängig sein mag.

Bei der Untersuchung der COB-Region war nun aufgefallen, daß etwa zwei Drittel der atmungsdefekten Punktmutanten in den Apocytochrom b-codierenden Bereichen kartieren, die physisch alles in allem nur etwa 14% der gesamten Gensequenz ausmachen (44). In diesen als Exons bezeichneten

Abschnitten erscheinen demzufolge Mutationen mit um das 12-fache höherer "Dichte" als in den nicht für dieses Protein codierenden, den sogenannten Introns. Es ist daher nicht abwegig analoge Mutantenanhäufungen in der OXI3-Region bevorzugt als exonische Bereiche zu interpretieren.

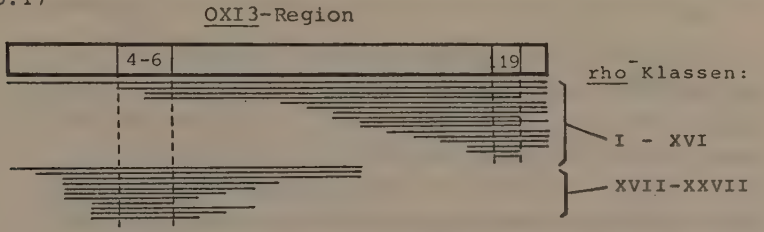
Eine weitere Möglichkeit, die ungleichmäßige Verteilung der genetischen Marker auf die Gruppen zu erklären, bietet sich in der Vorstellung an, daß die Deletionsendpunkte selbst nicht statistisch über das Genom verteilt auftreten, wodurch den Gruppen, die von den einander überlappenden Restgenomen der rho⁻Mutanten definiert werden (vgl. Abb.10), physisch unterschiedlich ausgedehnte Bereiche der mtDNS zugrunde liegen würden. Dies konnte auch tatsächlich für die Deletionen innerhalb der OXI3-Region gezeigt werden; wegen seiner besonderen Bedeutung soll dieser Punkt an späterer Stelle noch ausführlich diskutiert werden.

Betrachtet man die Bildung von rho⁻Genomen unter dem Aspekt, mit welcher Häufigkeit bestimmte Wildtyp-Segmente in der mtDNS der rho⁻Mutanten überleben, lassen sich regional erhebliche Unterschiede feststellen. Über das Genom der Bäckerhefe verteilt, treten sieben Abschnitte mit außerordentlich hoher Retention hervor, die von BERNARDI (98) entdeckt und als Startpunkte der Replikation (origins of replication) gedeutet wurden.

Zwar ließen sich auch in der vorliegenden Arbeit bei der Analyse der rho⁻Klone zwei derartige Abschnitte finden, wie die nachfolgende Skizze zeigt, doch fallen diese außerhalb der oben erwähnten klassischen ori-Sequenzen, was ein Hinweis darauf ist, daß rho⁻Genome auch ohne diese besonderen Regionen replikationsfähig sind. Mittlerweile wurden bei verschiedenen rho⁻Mutanten sehr kleine Surrogat-ori-Sequenzen identifiziert, die ersatzweise in Aktion treten können (110)

Folgende Skizze veranschaulicht, daß es innerhalb der OXI3-Region zwei Genbereiche bevorzugter Retention in den rho⁻ Restgenomen gibt: Die rho⁻ Klassen I - XVI haben die mit⁻ Gruppe 19, die Klassen XVII - XXVII die Gruppen 4 - 6 zurückbehalten (vgl. Abb.11-a).

Abb.17



Da eine erhebliche Menge der bei der rho⁻ Retentionskartierung untersuchten mit⁻ Mutanten nicht in die etablierten Gruppen einzuordnen war, wurde eine qualitative Rekombinationsanalyse in Angriff genommen. Diese Untersuchungsmethode (vgl. S.6) offenbarte, daß diese vermeintlichen mit⁻ Punktmutanten in Wirklichkeit selbst Deletionsmutanten sind, die erwähnten Einordungsschwierigkeiten in die genetische Karte also in den Kreuzungen auftraten, in welchen die rho⁻ und mit⁻ Deletionsbereiche einander so überschneiden, daß eine Rekonstitution des mitochondrialen Wildtypgenoms verunmöglicht ist.

Der überraschend hohe Anteil von ungefähr 20% der gesamten mit⁻ Genome weist nach den Daten der Rekombinationsanalyse Deletionen innerhalb der OXI3-Region auf; sie betreffen ca. 65% bis 80% der bekannten Genregion. Nach den Kriterien der genetischen Analyse sind diese Mutanten in neun Klassen (ΔI - ΔIX) einteilbar (vgl. Abb.9-a). Es scheint eine Besonderheit des Genes der Untereinheit I der Cytochrom c Oxidase zu sein, daß dieser Mutantentypus in dieser Häufigkeit gefunden wird, denn entsprechende Untersuchungen in anderen Bereichen der mtDNS ergaben ein prozentual weitaus geringeres Auftreten: Bei mit⁻ Mutanten des OXI1-Gens fand man unter

100 nur 3 (49), bei denen der COB-Region 3 Deletionen unter 200 (56).

Nachdem die Deletionen der mit⁻ Deletionsmutanten im OLI2-proximalen Bereich der OXI3-Region zusätzliche Differenzierungen der mit⁻ Gruppen zuließen, konnte die Karte auf diesem Wege weiter verfeinert und letztlich in 25 Cluster (C1 - C25) aufgelöst werden (siehe Abb.11-a).

Die zwischen den Repräsentanten einzelner Cluster durchgeführte quantitative Rekombinationsanalyse ergab keine Widersprüche zur Retentions- und Deletionskartierung und eine maximale Rekombinantenbildungsrate von 8,9% (gefunden aus der Kreuzung zwischen M2571 (C3) und M4191 (C23)),die damit etwas unter dem theoretischen Höchstwert von 12,5% bleibt. Die Lagebeziehungen der Mutantenmarker innerhalb der Cluster mit ausreichender Sicherheit zu bestimmen, wäre wegen der engen Kopplung (<1%) nur in sehr aufwendigen Kreuzungsansätzen realisierbar gewesen und war für die später beabsichtigten Versuche ohne besondere Relevanz.

Für die Orientierung der OXI3-Clusterabfolge im Verhältnis zu den anderen Regionen ergab sich:

OXI2 - PAR - C1.....C25 - PHO1/OLI2 - COB

Wie Daten von Sequenzanalysen zeigen, bewegt sich die Transkription in Richtung der ansteigenden Clusternummern der genetischen Karte (37).

2.) Phänotypen

Untersuchungen an der COB-Region des mitochondrialen Genoms der Bäckerhefe haben offenbart, daß bestimmte Mutanten-Phänotypen charakteristisch für die Exon-, andere für die Intron-Bereiche dieses Mosaikgenes sind (56).

Bevorzugt in den Exons kartieren atmungsdefekte mit^-_{cob} Mutanten , welche

- zusätzlich zu der spektralen Absorptionsbande des Cytochroms $\underline{aa}_3$ auch die des Cytochroms b voll zeigen.
- eine Verschiebung des Cytochrom b-Absorptionspeaks aufweisen.

Fast ausschließlich in den Introns zu finden sind dagegen

- solche Mutanten, die einen pleiotropen Phänotyp zeigen; sie haben im Spektrum sowohl Cytochrom b, als auch $\underline{aa}_3$ verloren.
- konditionelle Mutanten (temperaturempfindlich und leaky).

Wie durch Analysen der DNS-Sequenz mittlerweile gezeigt werden konnte, ist auch die OXI3-Region als ein solches 'split-gene', bestehend aus 8 Exons und einer entsprechenden Anzahl dazwischenliegender Introns, organisiert (37, 107). Dies war nun Anlaß, die phänotypischen Eigenschaften der $\underline{mit}^-_{oxi3}$Mutanten zu studieren , um daraus Hinweise für eine Zuordnung von genetischen Clustern zu den unterschiedlichen funktionellen Abschnitten des Genes zu erhalten.

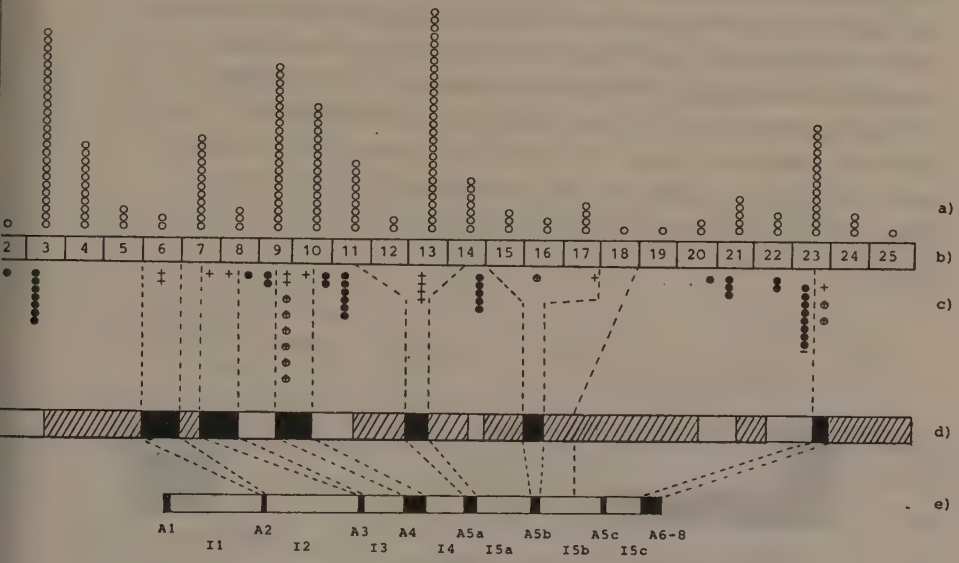
Unter den $\underline{mit}^-$Punktmutanten der OXI3-Region befindet sich, wie im Ergebnisteil ausgeführt, eine beträchtliche Anzahl temperatursensibler und leaky Mutanten (ca. 25%); diese treten teilweise deutlich geclustert auf. Es ist daher naheliegend, sie den Introns der OXI3-Region zuzuordnen, ebenso wie den Stamm M4595 (C23), die einzige ermittelte spektrale Doppelmutante.

Wiederum unter Heranziehung der bei COB gemachten Befunde lassen sich die 22 $\underline{mit}^-_{oxi3}$Mutanten, die im Spektrum neben der Absorptionsbande des Cytochroms b auch die des Cytochroms $\underline{aa}_3$ (teilweise mit shift) voll zeigen, als Exon-Mutanten interpretieren.

Im Folgenden ist nun, unter Heranziehung dieser Daten, eine mögliche Zuordnung von genetischer Karte einerseits und auf Sequenzanalysen fußender Mosaikstruktur des Genes andererseits, versucht worden.
Im oberen Teil der Abbildung ist die ungleichmäßige Verteilung der mit⁻Punktmutanten der OXI3-Region auf die 25 Cluster erkennbar (a) und (b). Unterhalb daran anschließend ist durch verschiedene Symbole ausgewiesen, welche Arten phänotypischer Besonderheiten (konditionelle und spektrale Charakteristika) und wieviele davon in dem jeweiligen Cluster auftreten (c). In Fällen, in denen im selben Cluster Phänotypen auftreten, die unterschiedlichen Strukturbereichen (Exon resp. Intron) zugeordnet werden können, sind diese Symbole im Bereich des betreffenden Clusters in zwei separaten vertikalen Reihen angeordnet. Atmungsdefekte Mutanten die Cytochrom aa_3 voll zeigen (teilweise mit shift), dürfen als missense-Mutanten gedeutet und exonischen Abschnitten des Gens zugeteilt werden. Diese Zuweisung ist unter (d) ebenso wie die bevorzugte Interpretation von Clustern konditionellen Mutanten als Intronmutanten, gezeigt. Die große Anzahl von Mutanten ohne phänotypische Auffälligkeiten wurde von einer Zuordnung ausgespart. Unter (e) ist die Mosaikstruktur des Genes nach den Sequenzstudien von BONITZ et al. (37) sowie HENSGENS et al. (107) dargestellt.

Die in Abb.16 gezeigte Korrelation wird durch Sequenzierungsbefunde (118) wahrscheinlich gemacht, die besagen, daß bei mit⁻Deletionsmutanten, die nach genetischen Daten die Cluster 6 - 18 deletiert haben, der Bereich vom Ende des Introns I1 bis zur Mitte des Introns I5b verlorengegangen ist. Das, nach Phänotypen, vor Cluster 18 liegende Exon wäre demnach A5b, das nächste davor A5a usw.

Abb.16 : Versuch einer Korrelation von genetischer Karte und dem aus Sequenzierungsdaten abgeleiteten Mosaikaufbau der OXI3-Region.



Zeichenerklärung:

(a) o = einzelne mit Punktmutante; vertikale Reihe zeigt Anzahl pro Cluster an.

(b) Numerierte Kästchen 1-25: Cluster der genetischen Karte.

(c) ● = Konditionelle Mutante.
+ = Mutante mit(annähernd) vollem Cyt.aa_3-Anteil im Spektrum.
⊕ = shift des aa_3-peaks
- = spektrale Doppelmutante (hat weder Cyt.aa_3 , noch Cyt.b) im Spektrum.

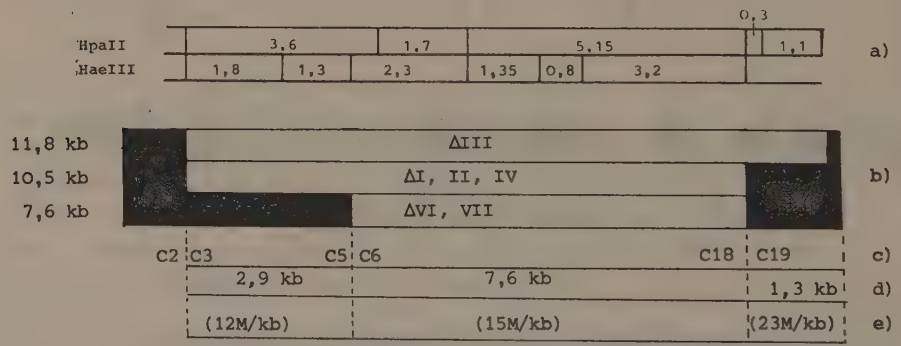
(d) Schwarze Balken: Wahrscheinliche Exon-Bereiche.
Weiße Balken: Wahrscheinliche Introns.
Schräg straffierte Balken: durch die phänotypischen Daten nicht-zuordenbare Abschnitte.

(e) Exon/Intron-Verteilung nach Sequenzdaten (8):
A1 - A8 sind Exons (schwarz); I1 - I5 sind Introns (weiß). Eine Besonderheit des Stammes KL 14-4A und 777-3A ist in der Darstellung berücksichtigt: Exon A5 ist durch zwei Introns I5a und I5b in drei Teilbereiche aufgetrennt: A5a, A5b und A5c (107).

3.) Restriktionsanalyse

Aus den Ergebnissen von Restriktionsanalysen von mit⁻Δ Mutanten der OXI3-Region konnte die Größen der Deletionen anhand der im Vergleich zum Wildtyp-Muster verlorenen Restriktionsfragmente kalkuliert werden. Das Verfahren einer Korrelation dieser Daten zur genetischen Karte sieht nun so aus, daß den in der jeweiligen Deletionsmutanten-Klasse fehlenden Sequenzen, - angegeben in Basenpaaren - die diesen verlorenen genetischen Cluster zugeordnet waren. Das Prinzip dieses Verfahrens und die aus den zugänglichen Daten möglichen Zuordnungen sind im folgenden Schema aufgeführt.

Abb.19



a) Die im Bereich der OXI3-Region gefundenen HpaII- und HaeIII-Restriktionsfragmente (vgl.(108).

b) Dunkle Balken: mtDNS zurückbehalten. Helle Balken: Umfang der Deletion in den mit⁻Deletionsmutanten-Klassen ΔI ...

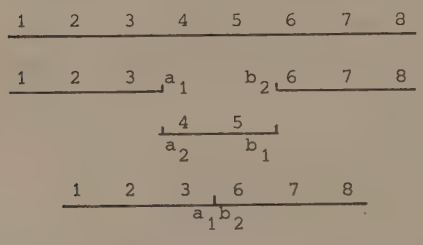
c) Angabe der Grenzcluster der genetischen Karte: Vertikale gepunktete Linien.

d) Angabe der physischen Längen. e) Zugeordnet die Anzahl der Marker pro kb im jeweiligen Abschnitt.

Den Mutanten-Klassen sind physisch bestimmte Deletionsgrößen zugeordnet:
Klasse ΔIII: 11.8 kb; Klasse ΔIV: 10.5 kb und Klasse ΔVIII: 7.3 kb.
Der aus den Kreuzungsdaten bekannte genetische Umfang der Deletionen erlaubt folgende Korrelation:
Clusterbereich C3 - C5 hat eine ungefähre physische Länge von 3,2 kb, C6 - C18 von 7,3 kb und C19 - C25 von 1,3 kb.
Die auf diesem Wege bestimmte Minimallänge der OXI3-Region beträgt damit 11,8 kb.

4.) Präferentielle Deletionsendpunkte

Für die Entfernung einer bestimmten Sequenz aus einem DNS-Molekül durch Deletion muß an zwei Positionen eine Trennung des Verluststücks vom Restgenom erfolgen. Genetisch sind diese Positionen der Deletionsentstehung definiert als die Bereiche zwischen den letzten, von dem Mutantengenom noch zurückbehaltenen (a_1 , b_2) und den lateralen der deletierten Cluster (a_2 , b_1).
Die nachfolgende Skizze soll dies veranschaulichen:



Wildtyp-mtDNS

Verlust der die Cluster 4 und 5 enthaltenden Sequenz durch Deletion

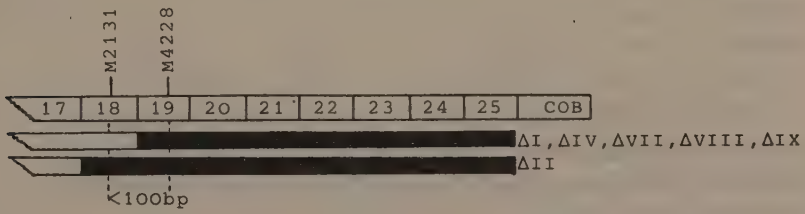
Restgenom der mit$^-_{oxi3}$-ΔMutante mit junction-Element (a_1b_2).

Wäre nun die Entstehungswahrscheinlichkeit von Deletionen an allen Punkten der mtDNS innerhalb der OXI3-Region gleich, müßten, - im Bereich statistischer Schwankungsbreite - die Deletionsentstehungsorte gleichmäßig verteilt sein. Setzt man die Anzahl der individuellen Deletionsmutanten (mit$^-$ und rho$^-$), die alle in einem bestimmten Clusterbereich einen Deletionsendpunkt haben, ins Verhältnis zu der Summe der insgesamt auftretenden Deletionsendpunkte, so fiele auf jede Position zwischen zwei Clustern im Durchschnitt 3% dieser Deletionspunkte.

Betrachtet man nun die tatsächliche Häufigkeitsverteilung dieser Bereiche, fällt ins Auge, daß offensichtlich präferentielle Positionen für die Entstehung von Deletionen existieren. Etwa 45% aller beobachteten Deletionen innerhalb der OXI3-Region entspringen im Bereich zwischen den Markern M2131 (C18) und M4228 (C19). Diese Marker sind nach den Ergebnissen der quantitativen Re-

kombinationsanalyse eng gekoppelt (<1% Rekombinanten). Die Resultate der Restriktionsanalyse legen es ebenfalls nahe, daß diese beiden Marker durch einen geringen physischen Abstand voneinander getrennt sind:
Nach der genetischen Analyse nämlich haben die mit⁻Δ - Mutanten-Klassen ΔI, ΔIV, ΔVII, ΔVIII und ΔIX Deletionen, die Cluster 18 mit einschließen, Cluster 19 dagegen ist Bestandteil des verbliebenen mitochondrialen Genoms. Bei der Deletionsmutanten-Klasse ΔII dagegen erstreckt sich die Deletion bis Cluster 17 einschließlich, vom Cluster 18 an ist die OXI3-Region in Transkriptionsrichtung erhalten:

Abb.20



mtDNS der OXI3-Region (Ausschnitt): ■ zurückbehaltenes Segment; ◁ deletierter Bereich; Rest des Genoms nicht gezeigt.

Dieser genetisch festgestellte Unterschied konnte bei der Restriktionsanalyse der entsprechenden Mutanten nicht ausgemacht werden; da nun die Auflösungsgrenze dieser Methode bei ca. 50 bp liegt, kann man annehmen, daß ein Markerabstand von mehr als 100 bp im Restriktionsmuster noch erfaßt worden wäre (108).

Weitere solcher "hot spots" der Deletionsentstehung ließen sich an folgenden Clustergrenzen entdecken:
C24/C25 : 10%
C22/C23 : 7.5%
C7/C8 : 6.5%

Es mag nun folgenden Einwand geben: Die gefundenen Präferenzen könnten - was die rho⁻Stämme aus den gleichen Induktionsansätzen betrifft - Folge einer nur zufälligen

Anhäufung von Mutantenindividuen eines bestimmten Deletionstyps sein (so gehören beispielsweise 26 individuelle rho⁻ Mutanen aus dem Induktionsansatz ie der Klasse IX an; vgl. Tab.3). Dagegen ist festzuhalten, daß die genannten präferentiellen Positionen in ihrer relativen Bevorzugung gegenüber den anderen erhalten bleiben, betrachtet man die Häufigkeit, mit der bestimmte Typen, die aus unabhängigen Induktionsansätzen stammen, (nicht Individuen), auftreten. Die folgenden Zahlen geben die Häufigkeit wieder, mit der bestimmte Clustergrenzen von verschiedenen rho⁻ Klassen (und unabhängig gewonnenen Subklassen) als Deletionsendpunkte benutzt werden:

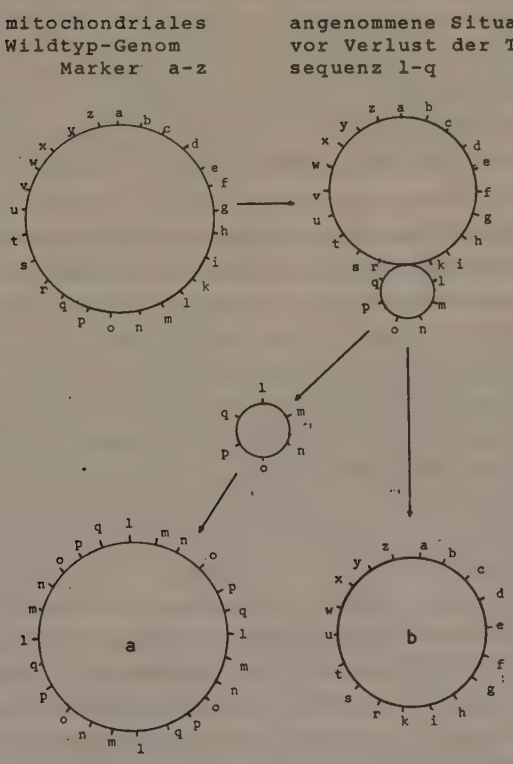
C18/C19 : 23%
C24/25 : 16%
C7/C8 : 11%
C22/C23 : 7.5%

Aus der Feststellung dieser - quantitativ abgestuften - Bevorzugung bestimmter Positionen ergibt sich die Frage nach dem molekularen Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegen könnte.

Die zuerst von BERNARDI und Mitarbeitern (111, 112) entwickelten Vorstellungen zur rho⁻ Bildung bieten dafür eine fruchtbare Diskussionsgrundlage. Danach beruht die rho⁻-Mutation auf der Excision einer definierten Sequenz aus einem der Wildtyp-mtDNS-Moleküle. Dieses excisierte Element stellt ein Monomer dar, welches in einem weiter nicht geklärten Amplifikationsprozeß bis zur Länge des Wildtyp-Genoms multimerisiert wird (Abb.21: ⓐ) und nach Segregation dieses reiterierten Teilgenoms in eine Tochterzelle kann diese zur Stammzelle eines rho⁻ Klons werden (113, 114). Dabei bleibt,(wie Abb.21 anschaulich zeigt: ⓑ) nach der Excision ein mtDNS-Restgenom zurück, - das Gegenstück zum rho⁻ Genom. Es ist daher naheliegend, beide Typen von Deletionsmutanten (rho⁻ und mit⁻) als komplementäre Produkte ein und desselben Bildungsprozesses zu betrachten. Es wäre lohnend, für die experimentelle Überprüfung dieser Annahme

im Anschluß an eine Mutanteninduktion nach dem parallelen Auftreten beider Deletionsmutantenformen zu suchen.

Abb. 21: Modell für die Bildung komplementärer Deletionsmutantenformen aus dem Wildtyp-Genom



rho⁻ Deletionsmutante: deletiertes Genomstück l-q wird zu Wildtypumfang amplifiziert

mit⁻ Deletionsmutante: Restgenom a-k...r-z ist die zur rho komplementäre Deletion

Den oben erwähnten Autoren (112) ist es nun gelungen zu zeigen, daß die mtDNS von Saccharomyces cerevisiae kurze Wiederholungssequenzen (repeats) in großer Zahl beinhaltet, die bei der Entstehung der rho⁻ Genome eine maßgebliche Rolle zu spielen scheinen: Diese treten sowohl in GC-reichen Clustern, als auch in deren pendants, den AT-spacern als direkte, invertierte oder in sich symmetrische Homologiesequenzen auf, die separat liegen oder auch einander überlappen können (97-99, 112). Da sie bei Analysen der Wildtyp-Sequenzen in den Endbereichen der rho⁻ Genom-Monomere gefunden wurden, liegt es nahe, sie als Excisions-Signale zu interpretieren.

Die große Anzahl, mit der solche repeats gefunden werden, mag die hohe Rate, mit der rho⁻ Mutationen schon spontan entstehen (1-2%), wie auch die relative Vielfalt der Deletionen erklären. Die Tatsache ihrer Existenz selbst macht die dabei gefundenen Präferenzen plausibel, da mit ihnen die Excision auf bestimmte Stellen festgelegt ist. Dazu wurde von MAROTTA und Mitarbeitern (115) ein Befund geliefert, der auf den Zusammenhang von der Ausdehnung der Sequenzhomologie und der Rate, mit der eine bestimmte Deletion auftritt, verwiesen wird: Aus einem Stamm der Bäckerhefe alle spontan gebildeten rho⁻-Mutanten untersucht, mit dem Ergebnis, daß 50% der Klone dasselbe, 2200 bp lange Genom-Monomer enthielten, das an den Enden von zwei außerordentlich langen Homologie-Sequenzen von je 265 bp flankiert ist. ALBERTINI und Mitarbeiter (116) konnten sogar eine abgestufte Abhängigkeit der Wahrscheinlichkeit, mit der eine bestimmte Homologiestelle zur Excision benutzt wird, von der Länge dieser Sequenz nachweisen. Sie untersuchten bei E. coli spontane Deletionen, die mit einer Länge von 700 bis 1000 bp auftreten: Bei 60% der examinierten Fälle wurde , bei Existenz mehrerer möglicher Homologiestellen, diejenige mit der längsten Sequenz für die Deletionsbildung benutzt.

Diese Befunde stützen das für den Mechanismus der Excision allgemein postulierte Modell, welches annimmt,

daß dem Deletionsvorgang eine der illegitimen Rekombination (117) vergleichbare Situation zugrunde liege. Die für Duplexbildung der DNS nötige Stabilität würde dabei durch die Homologie-Sequenzen erzielt; die Stabilität dürfte plausiblerweise von der Länge, Basenzusammensetzung und der Exaktheit der repeats abhängen.

Die von BERNARDI und Mitarbeitern (112) an spontan gebildeten rho⁻ Mutanten identifizierten repeats haben Längen von 9 bis 23 bp, andere Ethidiumbromid-induzierte Stämme weisen dagegen wesentlich kürzere Homologie-Elemente (3-4 bp) auf (117). Erstere sind als tandem-, letztere als palindrome-repeats organisiert. Diese Befunde deuten darauf hin, daß angesichts der geringen Spezifität der Homologie im Falle der palindrom-repeats solche 'Excisions-Signale' zwar Basis, nicht aber das einzige, den Mechanismus auslösende Element sein dürften.

Von SOR & FUKUHARA (117) wurde kürzlich von Untersuchungen an einigen rho⁻ Stämmen berichtet, die gezeigt haben, daß an der Bildung von deren Genomen durch Excision zwei invertierte repeat-Paare (Palindrome von je 6 - 10 bp Länge) beteiligt sind, was verschiedene Varianten der Zusammenlagerung der Homologie-Sequenzen ermöglicht und somit verschiedene Erklärungsmodelle zuläßt.

Zweifellos der einzig gangbare Weg festzustellen, ob auch im Falle der allem Anschein nach an präferrentiellen Stellen stattfindenden Bildung von mit⁻ Deletionen Sequenzhomologien eine Rolle spielen, ist der, die Wildtyp-Sequenz im Bereich der junction-Elemente zu analysieren (vgl. Skizze, S.77).

Erste, von SUCHY (118) unternommene Sequenzierungen in einem Bereich von ca.660bp um die Nahtstelle des junction-Segments der mit⁻ Mutante M3781 (ΔIX) herum, offenbarten bislang keine auffälligen Homologien, die als repeats in dem erwähnten Sinne betrachtet werden könnten. Das Feh-

len solcher Sequenzhomologien an den erwarteten Stellen (Ende Intron I1 und innerhalb des Introns I5b) könnte darauf zurückzuführen sein, daß der Deletionsprozeß mehrstufig verläuft und die sukzessive Ausweitung des Deletionsbereiches bevorzugt an bestimmten Positionen endet.

So bleibt abschließend festzuhalten, daß unter den mit Mutanten der OXI3-Region eine im Vergleich zu den anderen untersuchten mitochondrialen Genregionen, die für ein Polypeptid codieren, auffällige Häufung von Deletionen gefunden wird, wobei bestimmte Deletionsendpunkte gemäß genetischer Daten, präferentiell auftreten. Das Phänomen sequenzspezifischer Deletionen ist damit von den Seite der Genetik her hinreichend gesichert, wenn auch entsprechende Sequenzstrukuren bislang nicht entdeckt werden konnten.

ZUSAMMENFASSUNG

1. Es ist gelungen, in großer Zahl atmungsdefekte Mutanten der OXI3-Region zu isolieren und diese in genetischen Kreuzungsanalysen zu einer differenzierten Genkarte zusammenzuordnen: Es konnten 25 mit$^-$ Punktmutanten-Cluster unterschieden werden, von denen einige "hot spots" der Mutation darstellen.

2. Eine mit den kartierten mit$^-$ Stämmen durchgeführte qualitative Rekombinationsanalyse offenbarte die Existenz von Deletionen, die 65% - 80% der genetisch erfaßten Region ausmachen. Der Anteil solcher mit$^-$ Deletionsmutanten an der Gesamtzahl der untersuchten Stämme beträgt ca. 20% und liegt damit auffällig höher als bei anderen bereits untersuchten Protein-codierenden Regionen des mitochondrialen Genoms der Bäckerhefe.
   Durch Untersuchungen mit Restriktionsenzymen ließen sich die Deletionen bestätigen; die physische Analyse zeigt jedoch ein weniger differenziertes Spektrum von Deletionen als die genetische.

3. Phänotypische Untersuchungen an den Mutanten ergaben Material für eine Zuordnung von genetischer Karte zu der Mosaikorganisation der OXI3-Region.

4. Die Deletionen von rho$^-$ und mit$^-$ Mutanten der OXI3-Region entstehen, betrachtet man die Häufigkeitsverteilung der genetisch bestimmbaren Deletionsanfangs-(end-)punkte, an präferrentiellen Positionen, was einen Mechanismus der Deletionsentstehung nahelegt, der auf der Existenz von Homologiesequenzen beruht.

E) LITERATUR

(1) BORST, P. & GRIVELL, L.A. (1978)
"The mitochondrial genome of yeast" (Review)
Cell 15, 705 - 723

(2) GRIVELL, L.A. (1982)
"Restriction and genetic maps of yeast mitochondrial DNA." (Review)
in: Genetic maps. A compilation of linkage and restriction maps of genetically studied organisms. (O'BRIEN, S.J., Ed.), Vol.2
Lab. of viral carcinogenesis, National Cancer Institutes of Health, Frederick, M.D.

(3) BERNARDI, G. (1976)
"Molecular genetics of yeast mitochondria"
in: Genetics, biogenesis and bioenergetics of mitochondria. (BANDLOW, W.; SCHWEYEN, R.J.; WOLF, K. & KAUDEWITZ, F., Eds.)
De Gruyter, Berlin, New York; p. 69 - 84

(4) SCHWEYEN, R.J. & KAUDEWITZ, F. (1970)
"Proteinsynthesis by yeast mitochondria in vivo. Quantitative estimate of mitochondrially governed synthesis of mitochondrial proteins."
Biochem. Biophys. Res. Commun. 38, 728 - 735

(5) BERLANI, R.E.; BONITZ, S.G.; CORUZZI, G.; NOBREGA, M. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Transfer RNA genes in the cap-oxi1 region of yeast mitochondrial DNA."
Nucl. Acids Res. 8, 5017 - 5030

(6) BERLANI, R.E.; PENTELLA, C.; MACINO, G. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Isolation of mitochondrial transfer ribonucleic acid mutants and characterization of transfer ribonucleic acid genes of Saccharomyces cerevisiae."
J. Bacteriol. 141, 1086 - 1097

(7) BOLOTIN-FUKUHARA, M.; FAYE, G. & FUKUHARA, H. (1977)
"Temperature-sensitive respiratory deficient mitochondrial mutations: Isolation and genetic mapping."
Molec. Gen. Genet. 152, 295 - 305

(8) BONITZ, S.G. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequences of yeast mitochondrial tRNA genes."
J.Biol. Chem. 255, 9075 - 9081

(9) BOS, J.L.; OSINGA, K.A.; VAN DER HORST, G. & BORST, P. (1979)
"Nucleotide sequence of the mitochondrial structural genes for cysteine-tRNA and histidine-tRNA of yeast."
Nucl. Acids Res. 6, 3255 - 3266

(10) CORUZZI, G.; BONITZ, S.; THALENFELD, B.E. & TZAGOLOFF, A. (1981)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Analysis of the nucleotide sequence and transcripts in the oxi1 region of yeast."
J. Biol. Chem. 256, 12780 - 12787

(11) LI, M. & TZAGOLOFF, A. (1979)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequences of yeast mitochondrial valine and an unusual threonine tRNA gene."
Cell 18, 47 - 53

(12) MARTIN, N.C.; RABINOWITZ, M. & FUKUHARA, H. (1977)
"Yeast mitochondrial DNA species tRNA for 19 amino-acids. Deletion mapping of tRNA genes."
Biochemistry 16, 4672 - 4677

(13) MARTIN, N.C.; MILLER, D.L.; DONELSON, J.E.; SIGURDSON, C.; HARTLEY, J.L.; MOYNIHAN, P.S. & PHAM, H.-D. (1979)
"Identification and sequencing of yeast mitochondrial tRNA genes in mitochondrial DNA-pBR322 recombinants."

in: ICN-UCLA Symposia on molecular and cellular biology: Extrachromosomal DNA. (CUMMINGS, D.J.; BORST, P.; DAWID, I.B.; WEISSMAN, S.M. & FOX, C.F., Eds.), Vol. 15
Academic Press, New York, pp. 357 - 375

(14) MARTIN, R.P.; SIBLER, A.-P., BORDONNÉ, E.; CANADY, J. & DIRHEIMER, G. (1980)
"Nucleotide sequence and gene localization of yeast mitochondrial initiator $tRNA_f^{Met}$ and UGA-decoding $tRNA^{Trp}$.
in: The organization and expression of the mitochondrial genome (KROON, A.M. & SACCONE, C., Eds.) Elsevier, Amsterdam, pp. 311 - 314

(15) MILLER, D.L.; MARTIN, N.C.; PHAM, H.-D. & DONELSON, J.E. (1979)
"Sequence analysis of two yeast mitochondrial DNA fragments containing the genes for $tRNA^{ser}_{ucr}$ and $tRNA^{ser}_{uuy}$."
J.Biol. Chem.254, 11735 - 11740

(16) MILLER, D.L.; SIGURDSON, C.; MARTIN, N.C. & DONELSON, J.E. (1980)
"Nucleotide Sequence of the mitochondrial genes coding for $tRNA^{gly}$ and $tRNA^{val}$."
Nucl. Acids Res. 8, 1435 - 1442

(17) MILLER, D.L. & MARTIN, N.C. (1981)
"Organization and expression of a tRNA gene cluster in Saccharomyces cerevisiae mitochondrial DNA."
Curr. Genet. 4, 135 - 143

(18) NEWMAN, D.; PHAM, H.-D.; UNDERBRINK-LYON, K. & MARTIN, N.C. (1980)
"Characterization of tRNA genes in tRNA region II of yeast mitochondrial DNA."
Nucl. Acids Res. 8, 5007 - 5016

(19) NOBREGA, F.G. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and isolation of the mitochondrial glu-

tamic tRNA gene in Saccharomyces cerevisiae."
FEBS LETT. 113, 52 - 54

(20) WESOLOWSKI, M.; MONNEROT, M. & FUKUHARA, H. (1980)
"MboI, ThaI and HinfI endonuclease cleavage maps of the yeast mitochondrial DNA: Localization of transfer RNA genes."
Curr. Genet. 2, 121 - 129

(21) BOLOTIN-FUKUHARA, M. (1979)
"Mitochondrial and nuclear mutations that affect the biogenesis of the mitochondrial ribosomes of yeast."
Molec. Gen. Genet. 177, 39 - 46

(22) BOS, J.L.; OSINGA, K.A.; VAN DER HORST, G.; HECHT, N.B.; TABAK, H.F.; VAN OMMEN, G.J.B. & BORST, P. (1980)
"Slice point sequence and transcripts of the intervening sequence in the mitochondrial 21S ribosomal RNA gene of yeast."
Cell 20, 207 - 214

(23) DUJON, B. (1980)
"Sequence of the intron and flanking exons of the mitochondrial 21S rRNS gene of yeast strains having different alleles at the ω and rib-1 loci."
Cell 20, 185 - 198

(24) HEYTING, C. & MENKE, H.H. (1979)
"Fine structure of the 21S ribosomal RNA region on yeast mitochondrial DNA. III. Physical location of mitochondrial genetic markers and the molecular nature of ω."
Molec. Gen. Genet. 168, 279 - 291

(25) MERTEN, S.; SYNENKI, R.M.; LOCKER, J.; CHRISTIANSON, T. & RABINOWITZ, M. (1980)
"Processing of precursors of 21S ribosomal RNA from yeast mitochondria."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 77, 1417 - 1421

(26) LEVENS, D.; CHRISTIANSON, T.; EDWARDS, J.; LUSTIG, A.; TICHO, B.; LOCKER, J. & RABINOWITZ, M. (1982)
"Transcriptional initiation of yeast mitochondrial RNA and characterization and synthesis of mitochondrial RNA polymerase."
in: Mitochondrial genes (SLONIMSKI, P.P.; BORST, P. & ATTARDI, G., Eds.) Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, New York, pp. 295 - 310

(27) LI, M.; TZAGOLOFF, A.; UNDERBRINK-LYON, K. & MARTIN, N.C. (1982)
"Identification of the paromomycin-resistance mutation in the 15S rRNA gene of yeast mitochondria."
J.Biol. Chem. 257, 5921 - 5928

(28) OSINGA, K.A.; EVERS, A.F.; VAN DER LAAN, J.C. & TABAK, H.F. (1981)
"A putative precursor for the small ribosomal RNA from mitochondria of Saccharomyces cerevisiae."
Nucl. Acids Res. 9, 1351 - 1364

(29) SOR, F. & FUKUHARA, H. (1982)
"Nucleotide sequence of the small ribosomal RNA gene from the mitochondria of Saccharomyces cerevisiae."
idem ref. (26), pp. 255 - 268

(30) TABAK, H.F.; HECHT, N.B.; MENKE, H.H. & HOLLENBERGER, C.P. (1979)
"The gene for the small ribosomal RNA on yeast mitochondrial DNA: Physical map, direction of transcription and absence of an intervening sequence."
Curr. Genet. 1, 33 - 43

(31) MACINO, G. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequence analysis of a yeast mitochondrial ATPase gene containing the oli-2 and oli-4 loci."
Cell 20, 507 - 518

(32) HENSGENS, L.A.M.; GRIVELL, L.A.; BORST, P. & BOS, I.L. (1979)
"Nucleotide sequence of the mitochondrial structural gene for subunit 9 of the yeast ATPase complex."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 76, 1663 - 1667

(33) TZAGOLOFF, A.; NOBREGA, M.; AKAI, A. & MACINO, G. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Organization of yeast mitochondrial DNA in the oli1 region."
Curr. Genet. 2, 149 - 157

(34) FARRELLY, F.; ZASSENHAUS, H.P. & BUTOW, R.A. (1982)
"Characterization of transcripts from the Var1 region on mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae."
J. Biol. Chem. 257, 6581 - 6587

(35) STRAUSBERG, R.L.; VINCENT, R.D.; PERLMAN, P.S. & BUTOW, R.A. (1978)
"Asymmetric gene conversion at inserted segments on yeast mitochondrial DNA."
Nature 276, 577 - 583

(36) VINCENT, R.D.; PERLMAN, P.S.; STRAUSBERG, R.L. & BUTOW, R.A. (1980)
"Physical mapping of genetic determinants on yeast mitochondrial DNA affecting the apparent size of the var1 polypeptide."
Curr. Genet. 2, 27 - 38

(37) BONITZ, S.G.; CORUZZI, G.; THALENFELD, B.E.; TZAGOLOFF, A. & MACINO, G. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit 1 of yeast cytochrome oxidase."
J. Biol. Chem. 255, 11927 - 11941

(38) CARIGNANI, G.; DUJARDIN, G. & SLONIMSKI, P.P. (1979)
"Petite deletion map of the mitochondrial OXI3 region in Saccharomyces cerevisiae."
Mol. Gen. Genet. 167, 301 - 308

(39) GRIVELL, L.A. & MOORMAN, A.F.M. (1977)
"A structural analysis of the OXI3 region on yeast mtDNA."
in: Mitochondria 1977: Genetics and Biogenesis of mitochondria (BANDLOW, W.; SCHWEYEN, R.J.; WOLF, K. & KAUDEWITZ, F., Eds).
De Gruyter, Berlin, pp. 371 - 384

(40) GRIVELL, L.A.; ARNBERG, A.C.; HENSGENS, L.A.M.; ROOSENDAAL, E.; VAN OMMEN, G.J.B. & VAN BRUGGEN, E.F.J. (1980)
"Split genes on yeast mitochondrial DNA: Organization and expression."
in: idem ref. (14), pp. 37 - 49

(41) GRIVELL, L.A.; HENSGENS, L.A.M.; OSINGA, K.A.; TABAK, H.F.; ARNBERG, A.C.; BOER, P.H.; CRUSIUS, J.B.A.; VAN DER LAAN, J.C.; DE HAAN, M.; VAN DER HORST, G. & EVERS, R.F. (1982)
"RNA processing in yeast mitochondria"
in: idem ref. (26), pp. 225 - 239

(42) MORIMOTO, R.; LEWIN, A. & RABINOWITZ, M. (1979)
"Physical mapping and characterization of the mitochondrial DNA and RNA sequences from mit$^-$ mutants defective in cytochrome oxidase peptide-1."
Mol. Gen. Genet. 170, 1 - 9

(43) SLONIMSKI, P.P. & TZAGOLOFF, A. (1976)
"Localization in yeast mitochondrial DNA of mutations expressed in a deficiency of cytochrome oxidase and/or coenzyme QH_2-cytochrome c reductase."
Eur. J. Biochem. 61, 27 - 41

(44) VAN OMMEN, G.J.B.; BOER, P.H.; GROOT, G.S.P.; DE HAAN, M.; ROOSENDAAL, E.; GRIVELL, L.A.; HAID, A. & SCHWEYEN, R.J. (1980)
"Mutations affecting RNA splicing and the interaction of gene expression of the yeast mitochondrial loci."
Cell 20, 173 - 184

(45) CORUZZI, G. & TZAGOLOFF, A. (1979)
"Assembly of the mitochondrial membrane system. DNA sequence of subunit 2 of yeast cytochrome oxidase."
J. Biol. Chem. 254, 9324 - 9330

(46) FOX, T.D. (1979)
"Five TGA 'stop'codons occur within the translated sequence of yeast mitochondrial gene for cytochrome c oxidase subunit II."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 76, 6534 - 6538

(47) FOX, T.D. & BOERNER, P. (1980)
"Transcripts of the oxi-1 locus are asymmetric and may by spliced."
in: idem ref. (14), pp. 191 - 194

(48) KRUSZEWSKA, A.; SZCESNIAK, B. & CLAISSE, M. (1980)
"Recombinational analysis of oxi1 mutants and preliminary analysis of their translation products in Saccharomyces cerevisiae."
Curr. Genet. 2, 45 - 51

(49) WEISS-BRUMMER, B.; GUBA, R.; HAID, A. & SCHWEYEN, R.J. (1979)
"Fine structure of OXI1, the mitochondrial gene coding for subunit II of yeast cytochrome c oxidase."
Curr. Gen. Genet. 1, 75 - 83

(50) THALENFELD, B.E. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Sequence of the OXI2 gene of yeast mitochondrial DNA."
J. Biol. Chem. 255, 6173 - 6180

(51) ALEXANDER, N.J.; PERLMAN, P.S.; HANSON, D.K. & MAHLER, H.R. (1980)
"Mosaic organization of a mitochondrial gene. Evidence from double mutants in the COB-BOX region of Saccharomyces cerevisiae."
Cell 20, 199 - 206

(52) CHURCH, G.M.; SLONIMSKI, P.P. & GILBERT, W. (1979)
"Pleiotropic mutations within two yeast mitochondrial cytochrome genes block mRNA processing."
Cell 18, 1209 - 1215

(53) COLSON, A.M. & SLONIMSKI, P.P. (1979)
"Genetic localization of diuron- and mucidin-resistant mutants relative to a group of loci of the mitochondrial DNA controlling coenzyme QH_2-cytochrome c reductase in Saccharomyces cerevisiae."
Mol. Gen. Genet. 167, 287 - 298

(54) GRIVELL, L.A.; ARNBERG, A.C.; BOER, P.H.; BORST, P.; BOS, J.L.; VAN BRUGGEN, E.F.J.; GROOT, G.S.P.; HECHT, N.B.; HENSGENS, L.A.M.; VAN OMMEN, G.J.B. & TABAK, H.F. (1979)
"Transcripts of yeast mitochondrial DNA and their processing."
in: idem ref. (13), pp. 305 - 324

(55) GROSCH, G.; SCHMELZER, C. & MATHEWS, S. (1981)
"Physical map of the COB region in mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae."
Curr. Genet. 3, 65 - 71

(56) HAID, A.; SCHWEYEN, R.J.; BECHMANN, H.; KAUDEWITZ, F.; SOLIOZ, M. & SCHATZ, G. (1979)
"The mitochondrial COB region in yeast codes for apocytochrome b and is mosaic."
Europ. J. Biochem. 94, 451 - 464

(57) HALBREICH, A.; PAJOT, P.; FOUCHER, M.; GRANDCHAMP, C. & SLONIMSKI, P.P. (1980)
"A pathway of cytochrome b mRNA processing in yeast mitochondria: Specific splicing steps and an intron-derived circular RNA."
Cell 19, 321 - 329

(58) NOBREGA, F.G. & TZAGOLOFF, A. (1980)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: DNA sequence and organization of the cytochrome b gene in Saccharomyces cerevisiae D273-10B."
J. Biol. Chem. 255, 9828 - 9837

(59) SLONIMSKI, P.P.; PAJOT, P.; JACQ, C.; FOUCHER, M.; PERRODIN, G.; KOCHKO, A. & LAMOUROUX, A. (1978)
"Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. I. Genetic, physical and complementation maps of the box region."
in: Biochemistry and genetics of yeast: Pure and applied aspects. (BACILA, M. HORECKER, B.L. & STOPPANI, A.O.M., Eds), Academic Press, New York, pp. 339 - 368

(60) JACQ, C.; LAZOWSKA, J. & SLONIMSKI, P.P. (1980)
"Cytochrome b messenger RNA maturase encoded in an intron regulates the expression of the split gene: I. Physical location and base sequence of intron mutations."
in: idem ref. (14), pp. 139 - 152

(61) JACQ, C.; PAJOT, P.; LAZOWSKA, J.; DUJARDIN, G.; CLAISSE, M.; GROUDINSKI, O.; DE LA SALLE, H.; GRANDCHAMP , C.; LABOUESSE, A.; GARGOURI, A.; GUIARD, B.; SPYRIDAKIS, M. & SLONIMSKI, P.P. (1982)
"Role of introns in the yeast cytochrome b gene: cis- and trans-acting signals in intron manipulation, expression and intergenic communications."
in: idem ref. (26), pp. 155 - 184

(62) LAZOWSKA, J.; JACQ, C. & SLONIMSKI (1981)
"Slice points of the third intron in the yeast mitochondrial cytochrome b gene."
Cell 27, 12 - 14

(63) SCHWEYEN, R.J.; WEISS-BRUMMER, B.; BACKHAUS, B. & KAUDEWITZ, F. (1977)
"The genetic map of the mitochondrial genome including the fine structure of COB and OXI3 clusters."
in: idem ref. (39), pp. 139 - 148

(64) KOTYLAK, Z. & SLONIMSKI, P.P. (1977)
"Fine structure genetic map of the mitochondrial DNA region controlling coenzyme QH_2-cytochrome c reductase."
in: idem ref. (39), pp. 161 - 172

(65) BECHMANN, H.; HAID, A.; SCHWEYEN, R.J.; MATHEWS, S. & KAUDEWITZ, F. (1981)
"Expression of the split gene COB in yeast mtDNA."
J. Biol. Chem. 256, 3525 - 3531

(66) BECHMANN-HOLZNER, H., Promotionsarbeit, München (1981)

(67) SLONIMSKI, P.P.; CLAISSE, M.L.; FOUCHER, M.; JACQ, C.; KOCHKO, A.; LAMOUROUX, A.; PAJOT, P.; PERRODIN, G.; SPIRIDAKIS, A. & WAMBIER-KLUPPEL, M.L. (1979)
"Mosaic organization and expression of the mitochondrial DNA region controlling cytochrome c reductase and oxidase. III.- A model of structure and function."
in: idem ref. (59), pp. 391 - 401

(68) MAHLER, H.R.; HANSON, D.; MILLER, D.; LIN, C.C.; ALEXANDER, N.J.; VINCENT, R.D. & PERLMAN, P.S. (1978)
"Regulatory aspects of the mitochondrial biogenesis."
in: idem ref. (59), pp. 513 - 547

(69) HANSON, D.K.; MILLER, D.H.; MAHLER, H.R.; ALEXANDER, N.J. & PERLMAN, P.S. (1979)
"Regulatory interaction between mitochondrial genes. II. Detailed characterization of novel mutants mapping within one cluster in the cob 2 region."
J. Biol. Chem. 254, 2480 - 2490

(70) HAID, A.; GROSCH, G.; SCHMELZER, C.; SCHWEYEN, R.J. & KAUDEWITZ, F. (1980)
"Expression of the split gene COB in yeast mtDNA. Mutational arrest in the pathway of transcript splicing."
Curr. Genet. 1, 155 - 161

(71) GLOVES, D.M. & HOGNESS, D.S. (1977)
"A novel arrangement of the 18S and 28S sequences in a repeating unit of Drosophila melanogaster rDNA."
Cell 10, 167 - 176

(72) GOODMAN, H.M.; OLSON, M.V. & HALL, B.D. (1977)
"Nucleotide sequence of a mutant eukaryotic gene: The yeast tyrosine-inserting ochre suppressor SUP 4-O."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 74, 5453 - 5461

(73) VALENZUELA, P.; VENEGAS, A.; WEINBERG, F.; BISHOP, R. & RUTTER, W.J. (1978)
"Structure of phenylalanine-tRNA genes: An intervening segment within the region coding for tRNA."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 75, 190 - 194

(74) CRICK, F. (1979)
"Split genes and RNA splicing." (Review)
Science 204, 264 - 271

(75) MAHLER, H.R.; HANSON, D.; MILLER, D.; BILINSKI, T.; ELLIS, D.M.; ALEXANDER, N.J. & PERLMAN, P.S. (1977)
"Structural and regulatory mutations affecting mitochondrial gene products."
in: idem ref. (39), pp. 345 - 370

(76) ECCELSHALL, T.R.; NEEDLEMAN, R.B.; STORM, E.M.; BUCHFERER, B. & MARMUR (1978)
"A temperature-sensitive yeast mitochondrial mutant with altered cytochrome c oxidase subunit I."
Nature 273, 67 - 70

(77) GOLDRING, E.S.; GROSSMAN, L.J.; KRUPNIK, D.; CRYER, D.R. & MARMUR, J. (1970)
"The petite mutation in yeast. Loss of mitochondrial deoxyribonucleic acid during induction of petits with ethidium bromide."
J. Mol. Biol. 52, 323 - 335

(78) NAGLEY, P. & LINNANE, A.W. (1972)
"Biogenesis of mitochondria. XXI. Studies on the nature of the mitochondrial genome in yeast: The degenerative effect of ethidium bromide on mitochondrial genetic information in a respiratory competent strain."
J. Mol. Biol. 66, 181 - 193

(79) FAYE, G.; FUKUHARA, H.; GRANDCHAMP, C.; LASZOWSKA, J.; MICHEL, F.; CASEY, J.; GETZ, G.S.; LOCKER, J.; RABINOWITZ, M.; BOLOTIN-FUKUHARA, M.; COEN, D.; DEUTSCH, J.; DUJON, B.; NETTER, P. & SLONIMSKI, P.P. (1973)
"Mitochondrial nucleic acids in petite colonie mutants: deletion and repetition of genes."
Biochimie 55, 779 - 792

(80) LOCKER, J.; RABINOWITZ, M. & GETZ, G.S. (1974)
"Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of Saccharomyces cerevisiae."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 1366 - 1370

(81) LOCKER, J.; RABINOWITZ, M. & GETZ, G.S. (1974)
"Electron microscopic and renaturation kinetic analysis of mitochondrial DNA of cytoplasmic petite mutants of Saccharomyces cerevisiae."
J. Mol. Biol. 88, 489 - 507

(82) LAZOWSKA, J.; MICHEL, F.; FAYE, G. FUKUHARA, H. & SLONIMSKI, P.P. (1974)
"Physical and genetic characterization of petite and grande yeast mitochondrial DNA. II. DNA-DNA hybridization studies and buoyant density determinations."
J. Mol. Biol. 85, 393 - 410

(83) PUTRAMENT, A.; BARANOWSKA, H. & PRASMO, W. (1973)
"Induction by manganese of mitochondrial antibiotic resistance mutations in yeast."
Molec. Gen. Genet. 126, 357 - 366

(84) SCHWEYEN, R.J.; WEISS-BRUMMER, B.; BACKHAUS, B. & KAUDEWITZ, F. (1978)
"The genetic map of the mitochondrial genome in yeast. Map position of $drug^r$ and mit^- markers as revealed from population analysis of rho^- clones in Saccharomyces cerevisiae."
Molec. Gen. Genet. 159, 151 - 160

(85) DEUTSCH, J.; DUJON, B.; NETTER, P.; PETROCHILO, E.; SLONIMSKI, P.P.; BOLOTIN-FUKUHARA, F. & COEN, D. (1974)
"Mitochondrial genetics VI. The petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: interrelations between the loss of the rho^+ factor and the loss of the drug resistance mitochondrial genetic markers."
Genetics 76, 195 - 219

(86) BACKHAUS, B.; SCHWEYEN, R.J. & KAUDEWITZ, F. (1978)
"On the formation of petites in yeast. III. Effects of temperature on transmission and recombination of mitochondrial markers and rho^- cell formation in temperature sensitive mutants in Saccharomyces cerevisiae."
Molec. Gen. Genet. 161, 153 - 173

lation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency."
Biochim. biophys. Acta 162, 157 - 163

(88) WOLF, K.; DUJON, B. & SLONIMSKI, P.P. (1973)
"Mitochondrial genetics. V. Multifactorial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae."
Molec. Gen. Genet. 125, 53 - 90

(89) LANCASHIRE, W.E. & MATTOON, J.R. (1979)
Cytoduction: A tool for mitochondrial genetic studies in yeast."
Molec. Gen. Genet. 170, 333 - 344

(90) SCHWEYEN, R.J.; STEYRER, U. & KAUDEWITZ, F. (1976)
"Mapping of mitochondrial genes in Saccharomyces cerevisiae."
Molec. Gen. Genet. 146, 117 - 132

(91) PEACOCK, A.C. & DINGMAN, C.W. (1967)
"Resolution of multiple ribonucleic acid species by polyacrylamid gel electrophoresis."
Biochemistry 6, 1818 - 1827

(92) LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E.M. (1952)
"Replica-plating and indirect selection of bacterial mutants."
J. Bacteriol. 63, 399 - 406

(93) LANG, B., pers. Mitteilung

(94) LANG, B.; BURGER, G.; DOXIADIS, I.; THOMAS, D.Y.T.; BANDLOW, W. & KAUDEWITZ, F. (1977)
"A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms."
Anal. Biochem. 77, 110 - 121

(95) LEWIN, A.; MORIMOTO, R. & RABINOWITZ (1978)
"Restriction enzyme analysis of mitochondrial DNAs of petite mutants of yeast: Classification of petites, and deletion mapping of mitochondrial genes."
Molec. Gen. Genet. 163, 257 - 275

(96) FOURY, F. (1982)
"Endonucleases in yeast mitochondria. Apurinic and manganese-stimulated deoxyribonuclease activities in the inner mitochondrial membrane of Saccharomyces cerevisiae."
Eur. J. Biochem. 124, 253 - 259

(97) GAILLARD, C.; STRAUSS, F. & BERNARDI, G. (1979)
"Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast."
Nature 283, 218 - 220

(98) BERNARDI, G.; BALDACCI, G.; BERNARDI, G.; FAUGERON-FONTY, G.; GAILLARD, C.; GOURSOT, R.; HUYARD, A.; MANGIN, M.; MAROTTA, R. & DE ZAMAROCZY, M. (1980)
"The petite mutation: Excision sequences, replication origins and suppressivity."
in: idem ref. (14), pp. 21 - 31

(99) BALDACCI, G.; DE ZAMAROCZY, M. & BERNARDI, G. (1980)
"Excision sites in the GC clusters of the mitochondrial genome of yeast."
FEBS LETT. 114, 234 - 236

(100) BERNARDI, G. (1982)
"Evolutionary origin and the biological function of noncoding sequences in the mitochondrial genome of yeast."
in: idem ref. (26), pp. 269 - 278

(101) LOCKER, J.; RABINOWITZ, M. & GETZ, G.S. (1974)
"Tandem inverted repeats in mitochondrial DNA of petite mutants of Saccharomyces cerevisiae."
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 71, 1366 - 1370

(102) AUERBACH, C. & KIMBLEY, B. (1971)
"Mutation in Eukaryotes."
Ann. Rev. Genet. 5 163 - 218

(103) DUJON, B.; SLONIMSKI, P.P. & WEILL, L. (1974)
"Mitochondrial genetics IX: A model for recombination and segregation of mitochondrial genomes in Saccharomyces cerevisiae."
Genetics 78, 415 - 437

(104) FOURY, F. & TZAGOLOFF, A. (1978)
"Assembly of the mitochondrial membrane system: Genetic complementation of mit mutations in mitochondrial DNA of Saccharomyces cerevisiae."
J. Biol. Chem. 253, 3792 - 3797

(105) NETTER, P.; JACQ, C.; CARIGNANI, G. & SLONIMSKI, P.P. (1982)
"Critical sequences within mitochondrial introns: cis-dominant mutations of the apocytochrome b-like intron of the oxidase gene."
Cell 28, 733 - 738

(106) SANDERS, J.P.M.; HEYTING, C.; VERBEET, M.Ph.; MEIJLINK, F.C.P.W. & BORST, P. (1977)
"The organization of genes in yeast mitochondrial DNA. III. Comparison of the physical maps of the mitochondrial DNAs from three wildtype Saccharomyces strains."
Mol. Gen. Genet. 157, 239 - 261

(107) HENSGENS, L.A.M.; BONEN, L.; DE HAAN, M.; VAN DER HORST, G. & GRIVELL, L.A. (1983)
"Two intron sequences in yeast mitochondrial COX I gene: Homology among URF-containing introns and strain-dependent variation in flanking introns."

(108) SCHINDLER, Promotionsarbeit in Vorb.

(109) SOUTHERN, E.M. (1975)
"Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis."
J. Mol. Biol. 98, 503 - 517

(110) GOURSOT, R.; MANGIN, M. & BERNARDI, G. (1982)
"Surrogate origins of replication in the mitochondrial genomes of *ori*^{o} petite mutants of yeast."
EMBO J. 6, 705 - 711

(111) BERNARDI, G. (1979)
"The petite mutation in yeast."
TIBS 4, 197 - 201

(112) BERNARDI, G. & BERNARDI, G. (1980)
"Repeated sequences in the mitochondrial genome of yeast."
FEBS Lett. 115, 159 - 162

(113) PRUNELL, A. & BERNARDI, G. (1977)
"The mitochondrial genome of wildtype yeast cells. VI. Genome organization."
J. Mol. Biol. 110, 53 - 74

(114) FAUGERON-FONTY, G., CULARD, F.; BALDACCI, G.; GOURSOT, R.; PRUNELL, A. & BERNARDI, G. (1979)
"The mitochondrial genome of wildtype yeast cells. The spontaneous cytoplasmic 'petite' mutation."
J. Mol. Biol. 134, 493 - 537

(115) MAROTTA, R.; COLIN, Y.; GOURSOT, R. & BERNARDI, G. (1982)
"A region of extreme instability in the mitochondrial genome of yeast."
EMBO J. 5, 529 - 534

(116) ALBERTINI, A.M.; HOFER, M.; CALOS, M.P. & MILLER, J.H. (1982)
"On the formation of spontaneous deletions: The importance of short sequence homologies in the generation of large deletions."
Cell 29, 319 - 328

(117) SOR, F. & FUKUHARA, H. (1983)
"Unequal excision of complementary strands is involved in the generation of palindromic repetitions of rho⁻ mitochondrial DNA in yeast."
Cell 32, 391 - 396

(118) SUCHY, B.; Promotionsarbeit in Vorb.

Für die Anregung der vorliegenden Untersuchung möchte ich mich bei Herrn Prof.Dr.Schweyen bedanken, dessen Rat und Interesse die Arbeit stets hilfreich begleitet haben.

Weiterer Dank gebührt Frau Mathews und Herrn Suchy, Frau Dr.Burger und Herrn Dr.Lang für zahlreiche fruchtbare Diskussionen und praktische Hilfestellungen, sowie Frau Schindler für die Überlasseung von Restriktionsdaten.

Lebenslauf

Helmut Peter Bruckner

geboren am 29.Juli 1948

in Augsburg

1955 - 60	Besuch der Grundschule
1960 - 70	Humanistisches Gymnasium bei St.Anna in Augsburg
1970 - 78	Studium der Biologie an der Universität München
1979 - 82	Promotionsstudium bei Prof. Schweyen am "Institut für Genetik und Mikrobiologie" der LMU.
1983	Beginn der Arbeit bei Prof.Werner am "Institut für Physiologische Chemie, Physikalische Biochemie und Zellbiologie."